

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN ABBAU
VON ANGIOTENSIN II UND ANGIOTENSIN II-AMID
DURCH PEPTIDASEN DES MENSCHLICHEN PLASMAS*

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an den

Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Michael Zwanzig

aus Berlin

1973

* Auszugsweise mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
referiert auf dem 74. Internisten-Kongreß in Wiesbaden 1968
und veröffentlicht in:

1. Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für innere Medizin,
74. Band Seite 426-429, 1968
2. Zeitschrift für Klinische Chemie und Klinische Biochemie,
7. Jahrgang, Seite 253-258, Mai 1969

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik im Klinikum Steglitz
der Freien Universität Berlin

Vergleichende Untersuchungen über den Abbau von Angiotensin II
und Angiotensin II-Amid durch Peptidasen des menschlichen
Plasmas *

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Zwanzig, Michael
aus Berlin

- * Auszugsweise mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
referiert auf dem 74. Internisten-Kongreß in Wiesbaden 1968
und veröffentlicht in:
1. Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für innere Medizin,
74. Band Seite 426 - 429, 1968
 2. Zeitschrift für Klinische Chemie und Klinische Biochemie,
7. Jahrgang, Seite 253 - 258, Mai 1969

Referent: Professor Dr. med. Wolfgang Oelkers

Korreferent: Professor Dr. med. Dr. rer. nat. Heinz Tiedemann

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin



Promoviert am: 19.1.1973

INHALTSVERZEICHNIS

A. EINLEITUNG	5
I. Bisheriger Stand der Forschung	5
II. Begründung der eigenen Arbeit	9
B. METHODIK	12
I. Prinzip der Methoden	12
1. Der biologische Test an der Ratte	12
2. Der optische Test	13
II. Praktische Durchführung	15
1. Der biologische Test	15
a) Die Inkubation	15
α) Zur Wahl der Inkubationsbedingungen	16
β) Zur Durchführung von Inkubationsreihen	19
b) Der biologische Test an der Ratte	21
α) Präparation der Ratten für den Test	21
β) Überprüfung der Brauchbarkeit der Ratten für den Test	22
γ) Zur Durchführung von Testreihen	22
δ) Zur Auswertung	23
2. Der optische Test	24
a) Erster Schritt (Die Inkubation)	25
b) Zweiter Schritt (Überführung des Asparagins in Asparaginsäure)	25
c) Dritter Schritt (Bestimmung der Asparaginsäure im optischen Test)	26
C. VERSUCHE UND ERGEBNISSE	27
I. Versuche mit dem biologischen Test	27
1. Abhängigkeit der biologischen Inaktivierung der Sub- strate Angiotensin II und Angiotensin II-Amid vom pH-Wert	27
2. Die Beeinflussung der biologischen Inaktivierung von Angiotensin II und Angiotensin II-Amid durch Calcium- Ionen und Na ₂ EDTA in Abhängigkeit vom pH-Wert	28
3. Hemmung der biologischen Inaktivierung von Angioten- sin II und Angiotensin II-Amid durch Dialyse von Plasma gegen physiologische Kochsalzlösung und Na ₂ - EDTA-Lösung und ihre Reaktivierbarkeit durch zweiwertige Metallionen	29
a) Vorversuche	29
b) Dialyse von Mischplasma	30
c) Hauptversuche	31
d) Ergebnisse	32

II. Versuche mit dem optischen Test	34
1. Versuche mit Veronalpuffer	34
2. Versuche mit Trismaleatpuffer	36
3. Bestimmung der pH-Optimumkurve der Asparaginabspaltung aus Angiotensin II-Amid in Trismaleatpuffer	37
III. Zusammenfassung der Ergebnisse	39
1. Mit dem biologischen Test ermittelte Ergebnisse ..	39
2. Versuche mit dem optischen Test	40
D. GENAUIGKEIT DER METHODEN	41
I. Genauigkeit des biologischen Tests	41
II. Genauigkeit des optischen Tests	44
E. DISKUSSION	45
I. Zu den unterschiedlichen Ergebnissen anderer Autoren	45
II. Zu voneinander abweichenden Ergebnissen in der vorliegenden Arbeit	46
III. Zur Rolle der Aminopeptidasen als Angiotensinasen ...	49
IV. Zur Substratspezifität der Plasmaangiotensinasen	51
V. Zur Organ- und Gewebsspezifität der Angiotensinasen .	53
VI. Zur Inaktivierung von Angiotensin II Und Angiotensin II-Amid durch unterschiedliche Enzyme	55
VII. Zur Bedeutung der Inkubationszeit	57
VIII. Zu den einzelnen Angiotensinasen	58
1. Die "sauren" Angiotensinasen	58
2. Die "neutralen" Angiotensinasen	60
3. Die "alkalischen" Angiotensinasen	61
IX. Praktische Konsequenzen	62
F. ZUSAMMENFASSUNG	64
TABELLEN	67
ABBILDUNGEN	81
LITERATURVERZEICHNIS	90
LEBENSIAUF	94

A. EINLEITUNG

I. Bisheriger Stand der Forschung

In dem stark vasopressorisch wirksamen Octapeptid Angiotensin II wurde das bei der renovasculären Hypertonie die Blutdruckerhöhung bewirkende Agens vermutet (1,2). Die Biochemie der Angiotensinbildung ist heute weitgehend geklärt (3). Durch proteolytische Einwirkung von Renin auf sein Substrat Angiotensinogen (Renin-Substrat) entsteht zunächst das Decapeptid Angiotensin I, das vorwiegend in der Lunge (4,5) durch ein Converting enzyme unter Abspaltung eines Dipeptids vom Carboxylende in die eigentliche Pressorsubstanz Angiotensin II übergeführt wird.

Bei konstanter Renin- und Renin-Substratkonzentration könnte allein durch eine Änderung der Abbaugeschwindigkeit des Angiotensins seine Konzentration erhöht oder erniedrigt werden und daraus eine vermehrte bzw. verminderte Vasokonstriktion resultieren. Deshalb hat sich auch die Hypertonieforschung für die Biochemie des Angiotensinabbaus interessiert und in zunehmendem Maße an seiner Aufklärung mitgearbeitet.

Wird Angiotensin mit Plasma oder Gewebshomogenaten inkubiert, dann verliert es eine vasopressorische Wirksamkeit. Dies wird auf die Aktivität der im Plasma und in den Gewebshomogenaten enthaltenen Peptidasen zurückgeführt (3). Wahrscheinlich sind diese Enzyme auch für den Angiotensinabbau in vivo verantwortlich. Peptidasen, die Angiotensin inaktivieren, werden ungeachtet ihrer Substratspezifität Angiotensinasen genannt. Grundsätzlich können dies Amino-, Carboxy- und Endopeptidasen sein (6). Gezieltere Untersuchungen über die Bedeutung und den Angriffspunkt der einzelnen Angiotensinasen waren erst möglich, nachdem es gelungen war, ihr Substrat und eine Reihe von Substratanalogen zu synthetisieren.

1957 gelang SCHWYZER u. Mitarb. (7) sowie PAGE u. Mitarb. (8) die Synthese des beim Pferd, Schwein und Rind gebildeten Angiotensin II. Pferde- und Schweine-Angiotensin II haben die gleiche Sequenz der Aminosäuren: Asp¹-Arg-Val-Tyr-Ileu⁵-His-Pro-Phe. Beim Rinder-Angiotensin II ist das Isoleucin in Stellung 5 durch Valin ersetzt. Dieses α -L-Asp¹-Val⁵-Angiotensin II ist gemeint, wenn in Folgendem die Rede von Angiotensin II oder A ist. GROSS

u. Mitarb. (9) zeigten, daß das Ileu⁵- und das Val⁵-Angiotensin die gleiche biologische Wirksamkeit haben. Später fand ARAKAWA (10), daß die Struktur des menschlichen Angiotensins dem Pferde- und Schweine-Angiotensin mit Isoleucin in Stellung 5 der Aminosäuresequenz entspricht.

Bei den in der Natur vorkommenden Angiotensinen befindet sich die freie Aminogruppe der N-terminalen L-Asparaginsäure in α -Stellung zu der an der Peptidbindung beteiligten Carboxylgruppe. Neben diesen α -L-Angiotensinen wurde eine Vielzahl ähnlich gebauter Octapeptide sowie Struktur- und Stereoisomere der "natürlichen" Angiotensine synthetisiert (11). Unter ihnen hat das α -L-Asp¹(NH₂)-Val⁵-Angiotensin II, das im weiteren Text mit Angiotensin II-Amid oder H bezeichnet wird, eine besondere Bedeutung erlangt. Es ist unter dem Namen Hypertensin^R von der Firma CIBA für therapeutischen Gebrauch in den Handel gebracht worden. Mit den Isomeren und Derivaten der "natürlichen" Angiotensine konnten Fragen der Struktur-Wirkungsbeziehungen und des hier interessierenden Angiotensinabbaus geklärt werden.

REGOLI u. Mitarb. (12) untersuchten 1963 vergleichend die biologische Inaktivierung von α -L-Asp¹-, α -L-Asp¹(NH₂)-, α -D-Asp¹-, β -L-Asp¹-, β -D-Asp¹- und Desamino-Angiotensin II durch menschliches Plasma im neutralen pH-Bereich. Aus der wesentlich schnelleren Inaktivierung der α -L-Angiotensine schlossen sie, daß für ihren Abbau α -L-spezifische Aminopeptidasen entscheidend sind. Bei chromatographischen Untersuchungen der Spaltprodukte der Angiotensine fanden die Autoren bei allen genannten Octapeptiden eine Zerlegung in Tetrapeptide, die sie auf die Aktivität eines chymotrypsinähnlichen Enzyms zurückführten. Am Abbau der α -L-Angiotensine ist dieses Enzym, wie die Untersucher durch Vergleich mit dem Abbau der β -Formen zeigen konnten, in nur geringem Ausmaß von etwa 10 Prozent beteiligt. Die Autoren wiesen auch darauf hin, daß Angiotensin II-Amid (H) viel schneller inaktiviert wird als Angiotensin II (A). Ferner machten sie die Beobachtung, daß gereinigte Nieren-Leucinaminopeptidase A in 24 Stunden nur spurenweise, H aber zu 90 Prozent abbaut. Die letzten beiden Befunde sind auch ein erster Anhaltspunkt für die Vermutung, daß die beiden Substrate A und H durch unterschiedliche Enzyme inaktiviert werden. Zu dem gleichen Ergebnis hin-

sichtlich der Aminopeptidasen kamen KHAIRALLAH u. Mitarb. (13) durch ihren Befund, daß die pressorisch wirksamen Angiotensin-analogen β -Asp¹-, Arg¹- und Succinyl¹-Ileu⁵-Angiotensin II durch menschliches Plasma bei pH 7,4 im Gegensatz zum Angiotensin II-Amid in 60 Minuten kaum meßbar inaktiviert werden. Die Autoren wiesen auch darauf hin, daß die von ihnen so bezeichnete Angiotensinase A wahrscheinlich nicht mit der Leucinaminopeptidase (LAP) identisch ist, da die LAP im Gegensatz zur durch Calcium-Ionen aktivierbaren Angiotensinase A durch Magnesium-Ionen aktiviert wird und Arg¹-Angiotensin II hydrolysiert.

Die Bedeutung der Aminopeptidasen für den Angiotensinabbau wird auch von KLAUS u. Mitarb. (14) hervorgehoben. Sie beobachteten eine im Vergleich zum Abbau von Angiotensin II-Amid erheblich schnellere Hydrolyse des nach Abspaltung N-terminaler Aminosäuren vom Octapeptid resultierenden Hepta- und Hexapeptids und folgerten daraus, daß im physiologischen pH-Bereich des Plasmas die Abspaltung der N-terminalen Aminosäure der die Geschwindigkeit des Angiotensinabbaus bestimmende Schritt ist. In derselben Arbeit fanden die Autoren, daß die Eigenschaften der Serum-LAP mit Ausnahme ihrer Aktivierbarkeit durch Kobalt-Ionen denen der Serum-Angiotensinase entsprechen. KLAUS und BIRON (15) berichteten jedoch über eine vermehrte LAP-Aktivität im Plasma Schwangerer, die nicht mit einer Zunahme des Angiotensinabbaus einherging. Die Autoren vermuten deshalb, daß die Angiotensinase substratspezifischer als die LAP ist.

Bei einem Vergleich der Angaben in der Literatur über pH-Optimum, Hemmbarkeit und Reaktivierbarkeit der Angiotensinase-Aktivität des Plasmas bzw. Serums fällt auf, daß die von den Autoren ermittelten Daten recht stark voneinander abweichen. Einige Untersucher haben Angiotensin II (A) und andere Angiotensin II-Amid (H) als Substrat verwendet. Die bei einem Vergleich dieser beiden Untersuchergruppen feststellbaren Abweichungen der Angaben über Eigenschaften der Plasma-Angiotensinase lassen sich zu einem großen Teil durch die folgenden Befunde erklären, die dafür sprechen, daß A durch andere Plasmapeptidasen abgebaut wird als H.

Den ersten Anhaltspunkt dafür bietet die bereits auf Seite 6 zitierte Arbeit von REGOLI u. Mitarb. (12) mit der Feststellung,

daß H wesentlich schneller inaktiviert wird als A.

NAGATSU u. Mitarb. (16) fanden, daß die Hydrolyse von α -L-Aspartyl- und α -L-Glutamyl- β -Naphthylamid durch zugesetztes A kompetitiv gehemmt wird, nicht aber durch zugesetztes H. H hemmt dagegen die Hydrolyse von L-Leucyl- β -Naphthylamid kompetitiv, während A keinen Einfluß auf die Hydrolyse dieses Substrats hat. Ferner beobachteten die Autoren, daß der Abbau von A durch Calcium-Ionen aktivierbar und durch Nickel-Ionen total hemmbar ist. Der Abbau von H wird dagegen nicht durch Calcium-Ionen aktiviert und durch Nickel-Ionen nur partiell gehemmt.

OELKERS und v. GOLDACKER (17) untersuchten bei pH 6,4 und pH 7,2 mit einer im Teil B.II. der Arbeit auf Seite 24 genau angegebenen Methode die Asparaginsäureabspaltung von A und die Asparaginabspaltung von H quantitativ. Dabei fiel den Autoren ein unterschiedliches Verhältnis der Umsatzraten beider Substrate bei pH 6,4 und pH 7,2 auf. Bei gemeinsamer Inkubation der beiden Substrate A und H in gleicher Konzentration fanden sie eine Verminderung des Abbaus sowohl von A als auch von H im Sinne einer kompetitiven Hemmung. Dabei war die Abspaltung des Asparagins von H fast vollständig gehemmt, während die Asparaginsäureabspaltung von A nur zu 40 Prozent gehemmt war.

Alle hier genannten Befunde konnten nur mit der Vermutung erklärt werden, daß A und H durch unterschiedliche Enzyme abgebaut werden. Diese Vermutung konnte von KHAIRALLAH u. Mitarb. (18) für den Abbau der Substrate im neutralen pH-Bereich bestätigt werden. Die Autoren schüttelten Plasma mit einem aliquoten Teil Chloroform aus oder erhitzen es für 30 Minuten auf 60° C und stellten fest, daß derart behandeltes Plasma im Neutralen A nicht mehr inaktiviert, aber weiterhin H abbaut. In einer weiteren Arbeit konnten KHAIRALLAH und PAGE (19) ihren Befund bestätigen und dahingehend ergänzen, daß im neutralen pH-Bereich das pH-Optimum der Inaktivierung von A bei pH 6,8 und das der Inaktivierung von H bei pH 7,4 liegt.

Ältere Untersuchungen über die Angiotensinase-Aktivität des Plasmas bei Hypertonikern haben zu widersprechenden Ergebnissen geführt, während neuere Arbeiten keinen signifikanten Unterschied der Aktivität im Vergleich zu Normotonikern erkennen las-

sen (20,21). Es sind jedoch Zustände bekannt, bei denen die Angiotensinase-Aktivität des Plasmas gegenüber der Norm verändert gefunden werden kann. So berichteten NAGATSU u. Mitarb. (22), daß die Hydrolyse von α -L-Aspartyl- β -Naphthylamid bei Hypertonikern mit sekundärem Hyperaldosteronismus vermindert und bei Schwangeren im dritten Trimester erhöht ist. KLAUS und BIRON (15) fanden bei Personen mit hepatobiliären Erkrankungen die Angiotensinase-Aktivität signifikant erhöht. Sie beobachteten ebenfalls eine beschleunigte Hydrolyse von α -L-Aspartyl- β -Naphthylamid im letzten Drittel der Schwangerschaft. Die Autoren konnten jedoch zeigen, daß dies auf einer erhöhten Leucinaminopeptidase-Aktivität beruht, ein Befund, der erst kürzlich von OELKERS und v. GOLDACKER (23) bestätigt worden ist. Es muß dahingestellt bleiben, ob den Angiotensinasen des Plasmas eine pathophysiologische Bedeutung zukommt. Die Untersuchungen darüber sind noch im Gange.

Die biologische Bedeutung der Plasma-Angiotensinasen ist, wie neuere Arbeiten von KLAUS u. Mitarb. (24) sowie HODGE u. Mitarb. (25) zeigten, wahrscheinlich nur gering. Ihre Befunde sprechen nämlich eher dafür, daß der größere Teil sowohl infundierten als auch in vivo gebildeten Angiotensins in Organen wie Leber, Niere und Muskulatur oder auch in der Nähe der Rezeptoren in der Gefäßwand abgebaut wird.

II. Begründung der eigenen Arbeit

Obwohl den Plasma-Angiotensinasen wahrscheinlich eine nur geringe biologische Bedeutung zukommt, ist ihr genaueres Studium jedoch für folgende Belange wichtig:

1. Renin und Renin-Substrat können bislang nur indirekt über freigesetztes Angiotensin bestimmt werden. Damit bei der Bestimmung im Plasma die Plasma-Angiotensinasen nicht das während der Inkubation entstehende Angiotensin zerstören, muß ihre Aktivität sicher gehemmt werden. Dies gilt insbesondere für die im sauren pH-Bereich bei pH 5,5 wirksamen Angiotensinasen, da das Plasma im Laufe des Bestimmungsverfahrens für Renin und Renin-Substrat längere Zeit diesem leicht sauren Milieu ausgesetzt ist.

2. Zur Zeit der Durchführung dieser Experimente wurden zum er-

sten Mal Methoden zur radioimmunologischen Bestimmung von Angiotensin II veröffentlicht (28,29,30). Die radioimmunologische Bestimmung von Angiotensin II hätte den Blutdrucktest an der Ratte als letzten Schritt der Reninbestimmung ersetzen können. Für eine solche Methode wäre es wichtig, Inkubationsbedingungen zu finden, unter denen zwar die Angiotensinasen, nicht aber das Plasma-converting enzyme gehemmt werden. Solche Methoden sind später auch beschrieben worden (31,32). Neuerdings wird Renin jedoch mit Hilfe eines Angiotensin I-Radioimmunoassay bestimmt (33,34,35).

3. Bei den meisten bisherigen Untersuchungen über Angiotensinasen wurde Angiotensin II-Amid als Substrat verwendet. Auch für den Angiotensininfusionstest nach KAPLAN und SILAH (36) wird Angiotensin II-Amid benutzt. Es ist aber wahrscheinlich gemacht worden, daß dieses Substrat im neutralen pH-Bereich durch andere Plasmapeptidasen abgebaut wird als Angiotensin II (12,16,17,18, 19).

4. Da die Plasma-Angiotensinasen in das Plasma emigrierte Gewebs-Angiotensinasen sind, erleichtern genauere Kenntnisse über Eigenschaften der Angiotensinasen des Plasmas das Studium der Gewebs-Angiotensinasen, deren genauere Topik und Bedeutung noch im Einzelnen geklärt werden müssen.

Diese vier Punkte waren in Hinblick auf die zwar zahlreichen, aber oft voneinander abweichenden Einzelbefunde über Eigenschaften der Angiotensinasen der Anlaß, die Inaktivierung von Angiotensin II (A) und Angiotensin II-Amid (H) sowie die Abhängigkeit des Abbaus beider Substrate von der Konzentration zweiwertiger Metallionen über einen größeren pH-Bereich unter sonst gleichen Standardbedingungen vergleichend zu untersuchen. Da die zahlreichen Einzelbefunde mit verschiedenen Methoden und ganz unterschiedlichen Standardbedingungen gewonnen worden sind, lassen sich die Eigenschaften der A und H abbauenden Enzyme nur schwer miteinander vergleichen. Sicher sind nicht alle Unterschiede in den Angaben der Literatur über Eigenschaften der Angiotensinasen mit der zum Teil bestätigten Annahme zu erklären, daß die beiden Substrate A und H durch unterschiedliche Enzyme inaktiviert werden. Die Ergebnisse verschiedener Autoren divergieren auch dann noch zu einem großen Teil, wenn die Auto-

ren mit dem gleichen Substrat gearbeitet haben. Dafür sind in erster Linie Unterschiede in der Methode und den Standardbedingungen verantwortlich zu machen. Daher gestatten die Einzelergebnisse auch keinen korrekten Vergleich der bei verschiedenen pH-Werten am Abbau nur eines Substrats beteiligten Angiotensinasen.

Die Untersuchungen, deren Ergebnisse in dieser Arbeit vorgelegt werden, wurden in den Jahren 1967/68 durchgeführt.

B. METHODIK

I. Prinzip der Methoden

Zur Bestimmung der Aktivität von Enzymen, die Angiotensin II und seine vasopressorisch wirksamen Analogen inaktivieren, stehen zwei Wege zur Verfügung. Der Abbau kann einmal über die Messung der nach der Inkubation verbliebenen Substratmenge und zum anderen über die Bestimmung der während der Inkubation pro Zeiteinheit freigesetzten Menge an Abbauprodukten der Substrate quantitativ verfolgt werden. Bei der Bestimmung der verbliebenen Substratmenge wird die Summe aller zu einem Abbau führenden Schritte erfaßt. Es wird also die Gesamtaktivität des Plasmas unter den gegebenen Inkubationsbedingungen gemessen. Da ein Angiotensin-Radioimmunoassay zur Zeit der Durchführung dieser Untersuchungen noch nicht zur Verfügung stand, wurde auf die von vielen Autoren (12,13,20) verwendete Methode der biologischen Testung zurückgegriffen. Daneben wurde nach der Methode von OELKERS und v. GOLDBACKER (17) unter der Bedingung der Substratsättigung die Asparaginabspaltung von H mit einem DPN-H-abhängigen optischen Test bestimmt.

1. Der biologische Test an der Ratte

Kleine Angiotensinmengen lassen sich aufgrund ihrer vasopressorischen Wirksamkeit durch Vergleich mit der Blutdruckwirkung von Angiotensin-Standardlösungen mit der allen biologischen Testverfahren eigenen Fehlerbreite, aber noch hinreichender Genauigkeit (s. Teil D.I. dieser Arbeit) quantitativ bestimmen. Die unmittelbare Meßgröße ist der dosisabhängige Anstieg des arteriellen Mitteldruckes nach intravenöser Angiotensin-Injektion gemessen in Millimeter Quecksilbersäule. Die zu testenden Angiotensinmengen müssen dabei im Bereich der linearen Proportionalität der Dosis-Wirkungskurve liegen, der für jedes Tier ermittelt werden muß. Als geeignetes, gut auf Angiotensin ansprechendes Testtier hat sich die Ratte erwiesen. Die Injektion von nur einem Nanogramm A oder H führt an der Ratte bereits zu einem meßbaren Anstieg des arteriellen Mitteldruckes, und die Dosis-Wirkungskurve zeigt bis zu einer Angiotensinmenge von 20 Nanogramm eine fast lineare Proportionalität (37). SKEGGS u. Mitarb. (38) haben eine ausführliche Beschreibung der Methode, die nur wenig modifiziert übernommen wurde, gegeben.

Als Meßgröße für den Abbau von Angiotensin durch Plasma dient der Verlust an pressorischer Wirkung einer mit Plasma inkubierten kleinen Angiotensinmenge gegenüber einem nichtinkubierten Vergleichsansatz. Dabei wird die Summe aller während der Inkubation zu einer biologischen Inaktivierung führenden Reaktionen erfaßt. Diese Methode gestattet also keine Aussage über Zahl und Art der am Abbau beteiligten Enzyme. Sie mißt nur die globale Angiotensinaseaktivität des Plasmas unter den gegebenen Inkubationsbedingungen. Andere als enzymatische Inaktivierungsvorgänge lassen sich durch Kontrollansätze, die statt Plasma physiologische Kochsalzlösung enthalten, ausschließen. Da die Enzyme des Plasmas nicht mit Substrat gesättigt sind (14,17), können nur relative Enzymaktivitäten gemessen werden. Denn nur unter der Bedingung der Substratsättigung ist die Reaktionsgeschwindigkeit der Enzymkonzentration proportional. Unter standardisierten Inkubationsbedingungen läßt sich aber bei Änderung nur eines Parameters der Einfluß dieser Änderung auf die Enzymaktivität vergleichend feststellen. Auf die Methode der biologischen Testung konnte trotz der genannten Unzulänglichkeiten nicht verzichtet werden, da insgesamt nur vier Milligramm Angiotensin II zur Verfügung standen. Für andere Methoden, die die Bedingung der Substratsättigung erfüllen, werden pro Ansatz Substratmengen in der Größenordnung eines Milligramms benötigt (14, 17).

2. Der optische Test

Die Bedingung der Substratsättigung läßt sich mit Methoden erfüllen, die als Maß für die Enzymaktivität die Menge an freigesetzten Abbauprodukten des Angiotensins bestimmen. REGOLI u. Mitarb. (12) trennten z.B. die Reaktionsprodukte papierchromatographisch und verglichen die Farbreaktion visuell mit denen bekannter Mengen von Vergleichssubstanzen. Diese Methode gestattet jedoch nur semiquantitative Aussagen. Sie hat aber den Vorteil, daß sie alle Reaktionsprodukte erfaßt und eine Analyse des Abbaumodus zuläßt. KLAUS u. Mitarb. (14) inkubierten Serum mit einem Substratüberschuß Angiotensin II-Amid, trennten die Spaltprodukte papierchromatographisch und bestimmten nach Ninhydrinfärbung des Chromatogramms das aus H freigesetzte Valin durch optische Transparenzmessung. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß bei dieser Methode Reaktionen mitgemessen

werden, die für die biologische Inaktivierung keine oder nur eine geringe Bedeutung haben. GROSS (39) zeigte, daß das Hexapeptid Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe, das nach Abspaltung zweier Aminosäuren vom N-terminalen Ende des Octapeptids resultiert und noch die beiden Valinmoleküle enthält, bereits vasopressorisch unwirksam ist. Das Auftreten freier Valinmoleküle setzt aber einen weitergehenden Abbau des Angiotensins voraus.

1967 gaben OELKERS und v. GOLACKER (17) eine Methode an, die spezifisch den die Geschwindigkeit des Angiotensinabbaus bestimmenden Schritt, nämlich die Abspaltung der N-terminalen Aminosäure Asparaginsäure von A (14), unter der Bedingung der Substratsättigung mit einem DPN•H-abhängigen optischen Test mißt. Bei Verwendung von H als Substrat wird die abgespaltene N-terminale Aminosäure Asparagin durch Inkubation mit einem Überschuß Asparaginase aus Meerschweinchenplasma quantitativ in Asparaginsäure übergeführt und kann dann so im optischen Test bestimmt werden. Die Reaktionsabläufe sind in Abb. 1. in einer von den Autoren übernommenen Übersicht dargestellt.

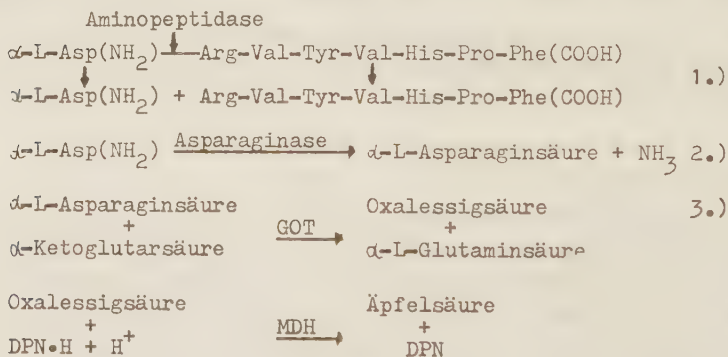


Abb. 1.: Übersicht der drei Schritte des optischen Tests

1.) Asparaginabspaltung durch die Amino-peptidase

2.) Überführung von Asparagin in Asparaginsäure

3.) Optischer Test

$\alpha\text{-L-Asp(NH}_2\text{)}$ = Asparagin. GOT = Glutamat-Oxalacetat-Transaminase.

MDH = Malatdehydrogenase

Der optische Test mißt die Summe der Aktivitäten aller Amino-peptidasen des Plasmas, die unter den jeweiligen Inkubationsbedingungen zu einer Freisetzung von L-Asparaginsäure bzw. L-Asparagin führen. Da die Bedingung der Substratsättigung erfüllt ist, werden absolute Amino-peptidase-Aktivitäten gemessen. Diese Methode wurde zu einem Vergleich der Asparaginabspaltung von H mit der biologischen Inaktivierung des gleichen Substrats herangezogen. Ein analoger Versuch mit dem Substrat A war nicht möglich, da von diesem Substrat nur insgesamt vier Milligramm zur Verfügung standen und pro Ansatz für den optischen Test Substratmengen in der Größenordnung eines Milligramms benötigt werden (17).

II. Praktische Durchführung

1. Der biologische Test

a) Die Inkubation

Da sich von Versuchsreihe zu Versuchsreihe nur ein Teil der Inkubationsbedingungen ändert, erscheint es zweckmäßig, ein allgemeingültiges Schema der Inkubationsbedingungen voranzustellen und anhand dieses Schemas die praktische Durchführung der Versuche zu erläutern. Um häufige Wiederholungen zu vermeiden, wird im Versuchsteil der Arbeit auf dieses Schema Bezug genommen. Bei den einzelnen Versuchsreihen werden dann nur noch die jeweiligen Modifikationen angegeben und besprochen.

Die biologische Inaktivierung von A und H wird als Verlust an vasopressorischer Wirksamkeit einer kleinen mit Plasma inkubierten Substratmenge gegenüber einem nichtinkubierten Vergleichsansatz bestimmt. Für jeden Einzelversuch werden also zwei Ansätze gleicher Zusammensetzung benötigt, einer zur Bestimmung des Nullwertes und einer zur Bestimmung des Zeitwertes der Inkubation. Um eine genau gleiche Zusammensetzung der beiden Ansätze zu gewährleisten, wurde gleich das doppelte Volumen des für einen Ansatz benötigten Reaktionsgemisches hergestellt und diese Menge (5 ml) dann nach guter Durchmischung auf die beiden Ansätze verteilt.

5 ml Reaktionsgemisch für die beiden Ansätze eines Versuchs enthielten:

1. 1,0 ml Substratlösung (500 ng A bzw. H / ml 0,9%iger NaCl-Lösung),
2. 0,5 ml Mischplasma von Normalpersonen bzw. 0,9%ige NaCl-Lösung für die Leerwerte,
3. 3,0 ml 0,05 m Trismaleatpuffer des gewünschten pH-Werts, der 166 mg Neomycinsulfat (Bykomycin^R) pro 100 ml Pufferlösung enthielt,
4. 0,5 ml 0,9%ige NaCl-Lösung oder eine Lösung mit den bei den Versuchsreihen angegebenen Inhibitoren oder (und) Reaktivatoren.

Inkubationstemperatur: 37° C.

Die Inkubationszeiten von A und H sowie die pH-Werte der Puffer werden bei den Versuchsreihen angegeben.

α) Zur Wahl der Inkubationsbedingungen

- Ad 1.: Das bei der biologischen Testung den Ratten injizierte Volumen der Probe sollte 0,2 ml betragen und, um nicht den Bereich der linearen Proportionalität der Dosis-Wirkungskurve zu überschreiten, maximal 20 Nanogramm Substrat enthalten. Daher wurde die Konzentration von A und H auf 10^{-7} g/ml Endansatz festgelegt.
- Ad 2.: Bei allen Versuchen war das Plasma im Endansatz 1:10 verdünnt. Bei Inkubation der gleichen Substratmenge mit im Endansatz nur 1:5 verdünntem Plasma und unter sonst unveränderten Bedingungen zeigte sich eine Nivellierung der pH-Optimumkurve, die eine sichere Aussage über pH-Optima der biologischen Inaktivierung nicht mehr gestattete. Dies kann mit der dann im Verhältnis zur Enzymmenge niedrigeren Substratkonzentration erklärt werden. Die Leerwertansätze, die statt Plasma 0,9%ige Kochsalzlösung enthielten, dienten dem Ausschluß eines Verlusts der pressorischen Wirkung von A und H, der nicht durch Angiotensinasen des Plasmas bedingt ist.
- Ad 3.: Bei der Wahl des Puffers zum Einstellen der gewünschten pH-Werte mußte berücksichtigt werden, daß der Puffer a) an der Ratte nicht toxisch wirkt, b) den Blutdruck der Ratte nicht beeinflußt, c) keine stabile Bindung mit zweiwertigen Metallionen eingeht und d) sich in einem

breiten pH-Bereich verwenden läßt.

Zu c): Eine feste Bindung von freien Calcium- oder anderen zweiwertigen Metallionen durch die Puffersubstanzen würde zu einer Hemmung der Aktivität der Plasma-Angiotensinasen führen (13,14,16,22) und Untersuchungen über den Einfluß der Konzentration zweiwertiger Metallionen auf die Angiotensinaseaktivität stören.

Zu d): Die Lage der pH-Optima der Angiotensinasen wird offenbar von der Art des verwendeten Puffers mitbestimmt (Vgl. S. 48). Bei Verwendung unterschiedlicher Puffer in den verschiedenen pH-Bereichen muß daher mit einem diskontinuierlichen Verlauf der pH-Optimumkurven gerechnet werden.

Die oben genannten vier Bedingungen a) bis d) werden am besten vom Trismaleatpuffer erfüllt, dem deshalb der Vorzug gegeben wurde.

Die Pufferkapazität des 0,05 m Trismaleatpuffers erwies sich bei Kontrollen der pH-Werte der Endansätze nur dann als ausreichend, d. h. die pH-Werte der Endansätze waren nur dann mit denen der zum Einstellen verwendeten Puffer identisch, wenn das Mischplasma und die bei vielen Versuchen benutzten Na_2EDTA - und Metallchloridlösungen zuvor neutralisiert worden waren. Daher wurden die genannten Lösungen vor dem Ansetzen der Reaktionsgemische auf pH 7,0 eingestellt.

Da A und H auch von Bakterien inaktiviert werden können (40), wurde allen Ansätzen das Antibioticum Neomycinsulfat (Bykomycin^R) zugesetzt. Durch die Anwesenheit von Plasma und die Inkubationstemperatur von 37° C sind für zahlreiche Bakterienarten optimale Lebens- und Vermehrungsbedingungen gegeben. Unter Neomycinsulfat in 0,1%iger Konzentration im Endansatz konnte auch nach sechsstündiger Inkubation in den Leeransätzen, die statt Plasma 0,9%ige NaCl-Lösung enthielten, kein Verlust an vasopressorischer Wirkung der Substrate festgestellt werden. Hingegen fanden sich bei einem hier nicht wiederge-

gegebenen Vorversuch zur Ermittlung günstiger Inkubationsbedingungen, bei dem ohne Neomycin gearbeitet worden war, in den inkubierten Leeransätzen Verluste an pressorischer Aktivität zwischen 10 und 20 Prozent, die bei einer Wiederholung des Versuchs mit dem Antibioticum nicht mehr aufgetreten sind. Diese Befunde sprechen für einen Abbau des Angiotensins durch Bakterien und zeigen, daß Neomycinsulfat in 0,1%iger Konzentration ausreichend bakteriostatisch und bakterizid wirkt, um den bakteriell bedingten Angiotensinabbau zu verhindern.

Ad 4.: Das hier eingesetzte Volumen von 0,5 ml wurde für Lösungen mit Inhibitoren und Reaktivatoren (Na_2EDTA und verschiedene Metallionen) benötigt. Kontrollansätze enthielten nur 0,9%ige NaCl-Lösung. Mit ihnen wurde die "normale" biologische Inaktivierung der Substrate bei den verschiedenen pH-Werten ermittelt.

Befunde von KHAIRALLAH u. Mitarb. (13), die später mehrfach bestätigt worden sind, zeigen, daß im neutralen pH-Bereich sowohl der Abbau von A als auch von H durch Na_2EDTA hemmbar ist, und daß diese Hemmung durch Calcium-Ionen aufgehoben werden kann. Auch andere zweiwertige Metallionen sind daraufhin untersucht worden, ob sie die EDTA-Hemmung aufheben. Für die eigenen Untersuchungen wurden diejenigen zweiwertigen Metallionen ausgewählt, von denen berichtet wird, daß sie die EDTA-Hemmung ganz oder teilweise aufheben, nämlich Ca^{++} , Co^{++} und Mn^{++} (13, 14, 19). Magnesium-Ionen wurden für die Untersuchungen herangezogen, weil sie als Cofaktor anderer Aminopeptidasen, wie z. B. der Serum-Leucinaminopeptidase (41), bekannt sind. Zink-Ionen die in diesem Zusammenhang wohl noch nie untersucht worden sind (in der einschlägigen Literatur ließ sich darüber kein Hinweis finden), wurden in die Reaktivierungsversuche miteinbezogen, weil beim Studium der Stabilitätskonstanten der verschiedenen Chelatkomplexe des EDTA mit zweiwertigen Metallionen die hohe Stabilitätskonstante des Zink-EDTA-Komplexes aufgefallen war und weil sich im sauren pH-Bereich die EDTA-Hemmung mit den anderen Metallionen nicht aufheben ließ.

Darauf wird an gegebener Stelle auf Seite 46 weiter eingegangen.

Um eine denkbare unterschiedliche Beeinflussung der Enzymaktivitäten durch verschiedene Anionen auszuschließen, wurden zur Herstellung der Metallionenlösungen nur Chloride der Metalle verwendet. Alle Metallchloridlösungen wurden aus den unter 3. genannten Gründen auf pH 7,0 eingestellt.

Sämtliche Inkubationen wurden bei dem mit 37° C angegebenen Temperatur-Optimum der Angiotensinasen (13) durchgeführt.

In Vorversuchen wurde unter den für die Bestimmung der pH-Optimalkurven der biologischen Inaktivierung von A und H gewählten Konzentrationsverhältnissen für das jeweils verwendete Mischplasma diejenige Inkubationszeit ermittelt, in der im neutralen pH-Bereich etwa 50 Prozent der eingesetzten Substratmenge inaktiviert werden. In Abb. 2 auf Seite 81 ist eine solche Bestimmung des zeitlichen Verlaufs der biologischen Inaktivierung von A und H dargestellt. Die Abbildung zeigt deutlich das auch von anderen Autoren (12,13,42) beobachtete Phänomen, daß sich die Inaktivierungsgeschwindigkeit beider Substrate jenseits der Halbwertszeit zunehmend verlangsamt. Darauf wird in der Diskussion auf Seite 57 weiter eingegangen. Dieser Befund war jedoch der Anlaß, die Inkubationszeit nicht über die Halbwertszeit hinaus zu verlängern.

B) Zur Durchführung von Inkubationsreihen

Alle zu einer Versuchsreihe gehörenden Ansätze wurden stets mit demselben Mischplasma und denselben Substratlösungen bereitet. Alle Ansätze einer Reihe wurden jeweils gemeinsam inkubiert. Dadurch lassen sich kleine Abweichungen der Inkubationsbedingungen, wie sie durch Unterschiede im Alter und in der Zusammensetzung der Lösungen und minimale Zeit- und Temperaturdifferenzen bei der Inkubation bedingt sein können, innerhalb einer gemeinsam inkubierten Serie ausschließen.

Die Substratlösungen wurden für jede Versuchsreihe neu eingesetzt, und zwar die Lösung mit A durch entsprechende Verdünnung einer 5 Gamma α -L-Asp¹-Val⁵-Angiotensin II pro Milliliter enthaltenden Stammlösung und die Lösung mit H durch Auflösen von 2,5 mg Hypertensin^R (α -L-Asp¹(NH₂)-Val⁵-Angiotensin II) und

entsprechende Verdünnung auf 500 ng/ml. Verdünnt wurde mit sterilisierter 0,9%iger NaCl-Lösung aus Infusionsflaschen. Die A enthaltende Stammlösung wurde zwischen den Versuchen bei minus 20° C in einer Tiefkühltruhe aufbewahrt.

Das Mischplasma, das aus heparinisiertem Blut gesunder Probanden gewonnen wurde, kam sofort nach dem Zentrifugieren in die Tiefkühltruhe. Vor allen Versuchen wurde das Plasma mit 1 n Salzsäure auf pH 7,0 eingestellt. Die dadurch bedingte minimale Verdünnung des Plasmas konnte unberücksichtigt bleiben, da bei den Versuchen nur die relativen Enzymaktivitäten interessierten.

Die Trismaleatpuffer wurden nach den Angaben in DOCUMENTA GEIGY, Wissenschaftliche Tabellen (43) unter pH-Meterkontrolle hergestellt. Die Pufferlösungen wurden im Kühlschrank bei 4° C und nie länger als zehn Tage aufbewahrt. Ihr pH-Wert wurde unmittelbar vor den Versuchen noch einmal mit dem pH-Meter kontrolliert und gegebenenfalls mit den Stammlösungen korrigiert.

Die im Schema auf Seite 16 unter 4. eingesetzten Metallchlorid- und Na₂EDTA-Lösungen wurden ebenfalls direkt vor den Versuchen unter pH-Meterkontrolle auf pH 7,0 eingestellt. Dabei wurde der pH-Wert an zunächst stärker konzentriert hergestellten Lösungen eingestellt, die dann auf das der gewünschten Endkonzentration entsprechende Volumen mit 0,9%iger NaCl-Lösung aufgefüllt wurden.

Alle Ansätze wurden in einem Eisbad mit im Kühlschrank auf etwa 4° C vorgekühlten Lösungen bereitet. Die Substratlösung wurde zuletzt, nachdem die Reagenzgläser bereits alle übrigen Lösungen enthielten, den Ansätzen zugegeben. Dadurch war es möglich, den Reaktionsbeginn hinauszuzögern und die Zeitdifferenz zwischen dem zuerst fertigen und dem zuletzt fertigen Reaktionsgemisch mit maximal drei Minuten so gering zu halten, daß sie beim Arbeiten im Eisbad sicher nicht ins Gewicht fällt. Sobald die Ansätze fertig waren, wurde nach vorsichtigem Mischen von jedem Ansatz für den Nullwert der Inkubation etwa die Hälfte in ein zweites Reagenzglas abgegossen. Anschließend wurden die Reagenzgläser mit Korkstopfen verschlossen und die nicht für die Inkubation vorgesehenen Vergleichsproben (Nullwerte) für zehn Minuten in ein kochendes Wasserbad und gleichzeitig alle für die Inkubation bestimmten Proben (Zeitwerte) in den auf 37° C einregulierten Inkubator gestellt. Nach der Inkubation kamen auch

diese Proben für zehn Minuten in ein kochendes Wasserbad. Dadurch werden die Plasmaproteine koaguliert und die Angiotensinasen inaktiviert. Nach dem Abkühlen wurden die Proben zehn Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde in Polystyrolröhrchen dekantiert und luftdicht verschlossen bis zur Testung an der Ratte bei -20° C eingefroren. Die Proben wurden in Polystyrolröhrchen aufbewahrt, da Angiotensin an Glas adsorbiert wird (40).

b) Der biologische Test an der Ratte

α) Präparation der Ratten für den Test

Junge, männliche, 150 bis 300 Gramm schwere Albino-Ratten wurden einen Tag vor dem Test in Pentobarbital-Natrium-Narkose (5 mg Nembutal^R pro 100 Gramm Körpergewicht intraperitoneal) beidseitig unter Belassen der Nebennieren nephrektomiert. Die Entfernung der Nieren erhöht erfahrungsgemäß die Ansprechbarkeit der Ratten auf Angiotensin, ohne daß sich dafür ein sicherer Grund angeben läßt (39).

Am nächsten Tag wurde den Ratten zur langanhaltenden Narkose 0,2 Gramm Urethan pro 100 Gramm Körpergewicht, als 20%ige Lösung in destilliertem Wasser, intramuskulär in den Oberschenkel injiziert. Um einer Verlegung der Atemwege vorzubeugen und den sich mit der Zeit ansammelnden Schleim absaugen zu können, wurden die Ratten nach Eintritt der anaesthetischen Wirkung tracheotomiert und ein passendes, etwa 2 cm langes PVC-Röhrchen in die Trachea eingebracht. Zur Injektion der Testlösungen wurde in die rechte Jugularvene ein PVC-Katheter eingebunden. Nach Injektion von 300 bis 500 IE Heparin in die Jugularvene und Durchtrennung des linken Nervus vagus wurde an die linke Arteria carotis communis über einen PVC-Katheter und ein mit Ringer-Lösung gefülltes Schlauchsystem ein Quecksilbermanometer angeschlossen. Um das extrakorporale Blutvolumen gering zu halten und keine Ringer-Lösung in den Kreilauf der Ratte gelangen zu lassen, wurde aus einer über einen Drei-Wege-Hahn mit dem Meßsystem verbundenen Druckflasche soviel Druck vorgegeben, daß der Blutspiegel im Karotis-Katheter gerade deutlich zu erkennen war. Der arterielle Mitteldruck der Ratte wurde über einen Trommelmymographen bei einem Papiervorschub von 4 mm/min registriert.

B) Überprüfung der Brauchbarkeit der Ratten für den Test

Hatte sich der arterielle Mitteldruck der Ratte nach dem Anschließen an das Quecksilbermanometer stabilisiert, wurde zunächst überprüft, ob die Ratte ausreichend proportional auf verschiedene Angiotensindosen anspricht. Dazu wurden nacheinander je 0,2 ml der Angiotensin-Standardlösungen mit 5, 10 und 20 ng Angiotensin II-Amid in die Jugularvene injiziert und überprüft, ob der arterielle Mitteldruck proportional der injizierten Angioteninmenge ansteigt. Da sich die Angiotensinempfindlichkeit der Ratte im Verlauf einer Testserie häufig ändert, muß das proportionale Ansprechen der Ratte auf verschiedene Angiotensindosen wiederholt kontrolliert werden. Ratten, die nicht mehr proportional reagierten, wurden für den Test nicht weiterverwendet, ebenso Ratten, deren Anstieg des arteriellen Mitteldrucks bei Injektion von 10 (20) ng H weniger als 10 (16) mm Hg betrug. Vergleiche hierzu auch Abbildung 3 auf Seite 82.

γ) Zur Durchführung von Testreihen

Die Angiotensin-Standardlösungen wurden an jedem Testtag neu angesetzt. Dazu wurde der Inhalt einer Ampulle Hypertensin^R CIBA (2,5 mg Angiotensin II-Amid) zunächst in 250 ml bidestilliertem Wasser aufgelöst und davon 1 ml 1:10 mit 0,067 m Phosphatpuffer pH 5,7 verdünnt. Diese 1 Gamma H pro ml enthaltende Stammlösung wurde dann mit dem gleichen Puffer 1:20, 1:10 bzw. 1:5 zu den Standardlösungen, die in 0,2 ml 5, 10 bzw. 20 ng H enthielten, verdünnt. Zur Verhütung einer bakteriellen Zersetzung des Angiotensins wurde den Standardlösungen Neomycinsulfat (Bykomycin^R) zugesetzt. Seine Konzentration im Endansatz betrug 0,1 Prozent. Die Kölbchen, die Stammlösung und die Standardlösungen enthielten, waren silikonisiert, um eine Adsorption des Angiotensins an das Glas (40) zu verhindern.

Erwies sich die Ratte für die Testzwecke geeignet, dann wurden die bis dahin eingefroren gewesenen Proben aufgetaut. Für den Fall einer Wiederholung der Tests wurden die Proben sofort nach Entnahme der Testmenge wieder eingefroren. Von allen Proben und den Standardlösungen wurden jeweils 0,2 ml injiziert. Um die Testlösung quantitativ aus dem durch den PVC-Katheter gegebenen Totraum in die Vene zu spülen, wurden sofort 0,2 ml Ringer-Lösung nachinjiziert. Die nächste Testlösung wurde immer erst

dann injiziert, wenn der pressorische Effekt der vorangegangenen Injektion vollständig abgeklungen war, also der arterielle Mitteldruck wieder seinen Basiswert erreicht hatte. Vor und nach Injektion einer zu testenden Probe wurde der Angiotensin-Standard injiziert, dessen Blutdruckwirkung der der Probe am nächsten lag. Bei einiger Erfahrung mit der Methode läßt sich gut abschätzen, welcher Standard am besten zum Vergleich mit der Probe geeignet ist. Gegebenenfalls wurde der Test mit dem geeigneteren Standard wiederholt. Um bei der Bestimmung des Verlusts an vasopressorischer Wirksamkeit des Angiotensins nach Inkubation die durch individuelle Unterschiede in der Angiotensinempfindlichkeit der Ratten bedingten Fehler auszuschließen, wurden der inkubierte Versuchsansatz (Zeitwert) und der zugehörige nichtinkubierte Vergleichsansatz (Nullwert) immer hintereinander an derselben Ratte getestet, wie es die Abbildung 3 auf Seite 82 zeigt.

5) Zur Auswertung

Da sich die Angiotensinempfindlichkeit der einzelnen Ratten in nicht vorhersehbarer Weise ständig ändert, ist es nicht möglich, den Verlust an vasopressorischer Wirkung des Angiotensins nach Inkubation direkt in mm Hg anzugeben. Deshalb wurde durch Vergleich der Blutdruckwirkung der Probe mit der Blutdruckwirkung der Standardlösung über einfache Dreisatzrechnung der Angiotensingehalt der Probe ermittelt (vgl. den Text der Abb. 3 auf Seite 82). Bei den nicht inkubierten Proben (Nullwerten) ist der Bezug der Blutdruckwirkung auf Nanogramm Angiotensin sicher korrekt. Bei den inkubierten Proben (Zeitwerten) kann der Einwand erhoben werden, daß das bei der Inkubation durch Abspaltung der N-terminalen Aminosäure vom Octapeptid entstehende Heptapeptid Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe noch etwa 50 Prozent der Blutdruckwirkung der Ausgangssubstanz besitzt (39). KLAUS u. Mitarb. (14) zeigten jedoch, daß das Heptapeptid wesentlich schneller hydrolysiert wird als das Octapeptid. Der Anteil des Heptapeptids an der Blutdruckwirkung der inkubierten Proben wird sich daher in zu vernachlässigenden Grenzen halten, sodaß auch die Blutdruckwirkung dieser Proben praktisch allein auf ihren Gehalt an Angiotensin bezogen werden kann. Das während der Inkubation ebenfalls entstehende Hexapeptid ist bereits blutdruckunwirksam (39).

Unterschied sich die Höhe des Blutdruckanstiegs bei vor und nach einer zu testenden Probe injiziertem gleichen Angiotensin-Standard nur wenig, dann wurde der Mittelwert der durch den Standard bedingten beiden Druckanstiege gebildet und mit diesem Mittelwert der Angiotensingehalt der Probe errechnet (vgl. den Text der Abb. 3 auf Seite 82). War die Differenz der durch die gleiche Standardlösung bedingten beiden Druckanstiege jedoch größer, hatte sich also die Angiotensinempfindlichkeit der Ratte zwischen den beiden Standard-Injektionen stärker geändert, dann wurde die betreffende Probe erneut getestet.

Die sich aus dem so ermittelten Angiotensingehalt der nichtinkubierten und der zugehörigen inkubierten Probe (Nullwert und Zeitwert) ergebende Differenz wurde ausgedrückt in Prozenten des Angiotensingehalts vom Nullwert (nichtinkubierte Probe) und als Prozent Angiotensinabbau oder als Prozent Verlust an pressorischer Wirkung angegeben.

2. Der optische Test

Diese Methode wurde genau so übernommen, wie sie von OELKERS und v.GOLDACKER (17) angegeben worden ist. Bei einem Teil der Versuche wurde jedoch die Substratmenge von 5 auf etwa 2 mg Angiotensin II-Amid reduziert, da wegen der Vielzahl der Ansätze die Substratmenge, die zur Verfügung stand, nicht ausgereicht hätte. Aber auch mit dieser reduzierten Substratmenge wird die für die Bestimmung der Angiotensinase-Aktivität gewünschte Bedingung der Substratsättigung erfüllt. Denn unter den gewählten Bedingungen ist die Substratkonzentration noch gut dreimal größer als die von den Autoren mit ihrer Methode ermittelte Michaeliskonstante der Angiotensinase mit Angiotensin II-Amid, die mit $2,35 \times 10^{-4}$ M/l angegeben wird.

Wie aus Abbildung 1 auf Seite 14 ersichtlich ist, erfolgt die Bestimmung des im ersten Schritt, der Inkubation des Angiotensin II-Amid mit Plasma, abgespaltenen Asparagins in zwei weiteren Schritten. Zunächst wird das abgespaltene Asparagin durch Inkubation mit einem Überschuß Asparaginase quantitativ in Asparaginsäure übergeführt (2.Schritt). Der letzte Schritt ist der eigentliche optische Test, mit dem quantitativ das in Asparaginsäure umgewandelte Asparagin bestimmt wird.

a) Erster Schritt (Die Inkubation)

Der Inhalt einer oder zweier Hypertensin^R-Ampullen (2,5 bzw. 5 mg Angiotensin II-Amid) wurde in 2 ml Trismaleat- oder Veronal-Puffer des gewünschten pH-Werts gelöst. Die Puffer wurden nach den Angaben in DOCUMENTA GEIGY, Wissenschaftliche Tabellen (43) unter pH-Meterkontrolle hergestellt. Von diesem Puffer-Substrat-Gemisch wurden 1,5 ml mit 0,5 ml auf pH 7,0 eingestellten Mischplasma oder 0,9%iger NaCl-Lösung (für die Leerwerte zur Bestimmung der Spontanhydrolyse) versetzt und eine Stunde bei 37° C inkubiert. Das Puffer-Substrat-Gemisch wurde mit auf ca. 4° C vorgekühlten Lösungen in einem Eisbad bereitet, um den Reaktionsbeginn bis zur Fertigstellung des letzten Ansatzes einer Versuchsreihe zu verzögern. Die Inhibitoren und Reaktivatoren (Na₂EDTA und CaCl₂) wurden direkt in Plasma gelöst, das anschließend mit 1 n Salzsäure oder Natronlauge auf pH 7,0 eingestellt wurde. Der durch das Einstellen des pH-Werts bedingte minimale Verdünnungsfaktor des Plasmas konnte unberücksichtigt bleiben, da die Angiotensinaseaktivitäten bei den verschiedenen pH-Werten vergleichend untersucht werden sollten und jeweils mit dem gleichen Plasma gearbeitet wurde.

Zur Fällung der Proteine und Inaktivierung der Angiotensinasen wurden anschließend an die Inkubation 0,2 ml 5 n HClO₄ zugegeben. Das Präzipitat wurde 20 Minuten bei 3000 U/min abzentrifugiert und verworfen. Der Überstand wurde mit 5 n KOH neutralisiert, wobei pH-Indikatorpapier zur Kontrolle des pH-Werts verwendet wurde.

b) Zweiter Schritt (Überführung des Asparagins in Asparaginsäure)

Von der nach a) erhaltenen neutralen Lösung wurden 1,5 ml mit 0,2 ml 0,67 m Na-Phosphatpuffer pH 7,2 und 0,2 ml Asparaginase-Lösung 90 Minuten bei 37° C inkubiert.

Die nach den Angaben von OELKERS und v. GOLDBACKER (17) aus Meerschweinchenplasma gewonnene Asparaginaselösung erwies sich bei der Inkubation mit entsprechenden Asparaginsmengen, wie sie unter den für den optischen Test gewählten Bedingungen bei der Inkubation von Angiotensinase-reichem Plasma mit einem Überschuß Angiotensin II-Amid freiwerden, als ausreichend aktiv,

d. h. die eingesetzten Asparaginsmengen konnten nach 60 Minuten Inkubation mit der Asparaginase-Lösung im optischen Test vollständig als Asparaginsäure nachgewiesen werden. Eine Angiotensinaseaktivität der Asparaginase-Lösung ließ sich durch Inkubation mit Angiotensin II-Amid ausschließen.

c) Dritter Schritt (Bestimmung der Asparaginsäure im optischen Test)

Optischer Test am Photometer "Eppendorf". Filter 366 m μ .
3 ml OS-Cuvetten, Schichtdicke 1 cm, Zimmertemperatur.

Nacheinander wurden in die Cuvetten pipettiert:

1. 1,86 ml 0,067 m Na-Phosphatpuffer pH 7,2,
2. 0,02 ml GOT ("Glutamat-Oxalacetat-Transaminase" der Fa. Boehringer, verdünnt auf 2,5 mg Protein/ml in 1,6 m Ammonsulfatlösung),
3. 0,02 ml MDH ("Malat-Dehydrogenase" der Fa. BOEHRINGER, verdünnt auf 2,5 mg Protein/ml in 2,8 m Ammonsulfatlösung),
4. 0,05 ml einer 1%igen DPN-H-Lösung (Fa. Boehringer)
5. 1,00 ml Inkubationsgemisch von Schritt 2.

Der Cuvetteninhalt wurde gut gemischt und die Extinktion E_1 gegen bidestilliertes Wasser abgelesen. Dann wurde die Reaktion gestartet durch Zugabe von

6. 0,05 ml einer 0,1 m Na- α -Ketoglutaratlösung in bidestilliertem Wasser.

Jetzt wurde erneut gut durchgemischt und nach genau 10 Minuten die Extinktion E_2 abgelesen. Wegen der Verdünnung des Cuvetteninhalts nach Ablesen von E_1 durch die Zugabe von 0,05 ml Ketoglutaratlösung muß E_1 durch Multiplikation mit dem Faktor 0,98 korrigiert werden (E_1 kor.).

Da es sich um vergleichende Untersuchungen handelt, wurde auf die Umrechnung in mg Asparaginsäure und in Internationale Einheiten verzichtet. Als Ergebnisse sind nur die Extinktionsänderungen (ΔE) angegeben worden. Formeln zur Umrechnung finden sich in der Arbeit von OELKERS und v. GOLDACKER (17).

C. VERSUCHE UND ERGEBNISSE

Das praktische Vorgehen bei den Versuchsreihen, die allgemeinen Inkubationsbedingungen sowie die Durchführung der Messungen wurden im vorangegangenen Teil B. besprochen, sodaß hier nur noch die speziellen, sich nach den jeweiligen Fragestellungen richtenden Besonderheiten der einzelnen Versuchsreihen mitzuteilen sind.

I. Versuche mit dem biologischen Test

Um die Bewertung der Einzelergebnisse zu erleichtern, wird hier die auf Seite 43 ermittelte Signifikanzgrenze der mit dem biologischen Test gefundenen Inaktivierungsraten vorangestellt. Für $P = 0,05$ liegt die Signifikanzgrenze bei 13%. Das heißt: Inaktivierungsraten von mehr als 13%, ermittelt als Verlust an pressorischer Wirkung der eingesetzten Substratmenge nach Inkubation, können mit 95%iger Wahrscheinlichkeit auf Enzymaktivitäten zurückgeführt werden.

1. Abhängigkeit der biologischen Inaktivierung der Substrate Angiotensin II und Angiotensin II-Amid vom pH-Wert

Die biologische Inaktivierung von A und H wurde bei den in den Tabellen 1 bis 6 angegebenen pH-Werten vergleichend untersucht.

Da A etwa zwölfmal langsamer inaktiviert wird als H, wurde H 10 Minuten und A 120 Minuten inkubiert. Unter Punkt 4. des auf Seite 14 angegebenen Inkubationsschemas wurde 0,9%ige NaCl-Lösung eingesetzt. Zu jedem pH-Wert eines jeden Substrats wurde ein Leerwert, der statt Plasma 0,9%ige NaCl-Lösung enthielt, mitinkubiert, um eine mögliche Spontanhydrolyse auszuschließen. Bis auf die nur einmal getesteten Leerwerte wurden alle Proben an zwei verschiedenen Ratten getestet. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 1 bis 3 wiedergegeben und in den Abbildungen 4 und 5 graphisch dargestellt.

Für die folgende Versuchsreihe wurde ein neues Mischplasma verwendet. Um vergleichbare Ergebnisse zu bekommen, mußte mit dem neuen Plasma diese Testreihe in der gleichen Weise wiederholt werden. Somit liegen für die Bestimmung der Abhängigkeit der biologischen Inaktivierung der Substrate A und H vom pH-Wert insgesamt vier Meßreihen je Substrat vor, für jedes Plasma zwei, da jeder Ansatz an zwei Ratten getestet wurde. Die Mittelwerte

aller Meßreihen sind in Tab. 4 und Abb. 6 wiedergegeben.

Die Ergebnisse zeigen für beide Substrate drei pH-Optima der biologischen Inaktivierung: ein kleines, für beide Substrate gleiches, im Säuren bei pH 5,6; ein größeres im Alkalischen, das für A bei pH 7,6 bis 8,0 und für H jenseits des möglichen Anwendungsbereichs des Trismaleatpuffers im Alkalischen von pH 8,6 liegt; und das absolut größte, daß für A bei pH 6,8 und für H bei pH 7,2 liegt. Die Substrate A und H werden durch 1:10 verdünntes Plasma im Neutralen und Alkalischen bei unterschiedlichen pH-Optima inaktiviert. Für eine vergleichbare Inaktivierung muß A in vitro im gesamten hier untersuchten pH-Bereich zwölfmal länger inkubiert werden als H.

2. Die Beeinflussung der biologischen Inaktivierung von Angiotensin II und Angiotensin II-Amid durch Calcium-Ionen und Na₂EDTA in Abhängigkeit vom pH-Wert

Wie oben unter C.I.1. erwähnt, wurde eine weitere Reihe von Ansätzen zur Bestimmung der pH-Optimumkurven der biologischen Inaktivierung mit neuem Mischplasma hergestellt. Gleichzeitig wurde der Einfluß von Calcium-Ionen und Na₂EDTA auf die Substratinaktivierung untersucht. Dazu wurden zu jedem pH-Wert weitere Ansätze mitinkubiert, denen unter Punkt 4. des auf Seite 14 angegebenen Inkubationsschemas statt der 0,5 ml 0,9%iger NaCl-Lösung in einer Serie 0,5 ml einer 10⁻² molaren CaCl₂-Lösung, in einer anderen Serie eine 10⁻² molare Na₂EDTA-Lösung und in einer dritten Serie eine Lösung mit 10⁻² M Na₂EDTA und 3x10⁻² M CaCl₂ zugesetzt wurden. Da die 0,5 ml dieser Lösungen im Endansatz auf 5 ml verdünnt waren, waren die Endkonzentrationen der genannten Substanzen um eine Zehnerpotenz kleiner als in den zugesetzten Stammlösungen.

Die Ergebnisse der biologischen Testung dieser Inkubationsreihen sind in den Tab. 8 bis 13 wiedergegeben und in den Abb. 7 und 8 graphisch dargestellt.

Für das Substrat A zeigt sich:

Calcium in 10⁻³ molarer Konzentration allein zugesetzt, hat in dem gesamten untersuchten pH-Bereich keinen Einfluß auf die biologische Inaktivierung.

Na₂EDTA in 10⁻³ molarer Konzentration hemmt die biologische

Inaktivierung im Sauren (pH-Optimum 5,6) und Alkalischen (pH-Optimum bei 7,6 bis 8,0) vollständig, im Neutralen (pH-Optimum 6,8) ist es ohne Einfluß.

Die EDTA-Hemmung kann im Alkalischen durch einen zweifachen Überschuß Calciumchlorid praktisch vollständig, im Sauren jedoch nicht aufgehoben werden.

Für das Substrat H ergibt sich:

Calciumchlorid (10^{-3} m) hat keinen Einfluß auf die biologische Inaktivierung im Sauren und Neutralen, hemmt sie jedoch teilweise im Alkalischen.

Na_2EDTA (10^{-3} m) hemmt die biologische Inaktivierung nur im Sauren.

Die EDTA-Hemmung im Sauren kann durch Calciumchlorid im zweifachen Überschuß nicht aufgehoben werden.

Im Ansatz mit Na_2EDTA (10^{-3} m) und CaCl_2 (3×10^{-3} m) zeigt sich im Alkalischen eine Hemmung der Angiotensinasen, die der durch CaCl_2 allein (10^{-3} m) entspricht.

Mithin zeigen die beiden Substrate A und H bezüglich der Beeinflussbarkeit ihrer biologischen Inaktivierung durch CaCl_2 und Na_2EDTA im sauren und neutralen pH-Bereich ein identisches Verhalten. Im Alkalischen hingegen ergeben sich Unterschiede. EDTA hemmt hier nur die biologische Inaktivierung von A. Calciumchlorid, das keinen Einfluß auf die Inaktivierung von A hat, hemmt jedoch teilweise die von H. Diese Hemmung wird durch Zugabe von 10^{-3} m Na_2EDTA bei 3×10^{-3} m Calciumkonzentration nicht signifikant beeinflusst.

3. Hemmung der biologischen Inaktivierung von Angiotensin II und Angiotensin II-Amid durch Dialyse von Plasma gegen physiologische Kochsalzlösung und Na_2EDTA -Lösung und ihre Reaktivierbarkeit durch zweiwertige Metallionen

a) Vorversuche

In Vorversuchen wurden die verwendeten Lösungen von Chloridsalzen zweiwertiger Metalle (CaCl_2 , MgCl_2 , ZnCl_2 , MnCl_2 und CoCl_2) daraufhin untersucht, ob sie von den Ratten toleriert werden, einen pressorischen Effekt haben und die Angiotensinempfindlichkeit der Ratten beeinflussen.

Dazu wurden Metallchloridlösungen verschiedener Konzentrationen bis zu einer Maximalkonzentration von 2×10^{-2} m aus analysenreinen Substanzen der Fa. Merck hergestellt. 0,2 ml dieser Lösungen wurden den Ratten unter laufender Registrierung des arteriellen Mitteldrucks am Kymographen in die Jugularvene injiziert. Vor und nach Injektion der Metallchloridlösungen wurden jeweils 0,2 ml einer Angiotensin-Standardlösung, die entweder 10 oder 20 ng Angiotensin enthielt, appliziert. Der pressorische Effekt des vor Metallchloridgabe injizierten Angiotensin-Standards wurde nun mit dem nach Gabe des Metallchlorids verglichen.

Dabei zeigte sich, daß Calcium-, Magnesium- und Zinkchlorid bis zu einer Konzentration von 2×10^{-2} m ohne Einfluß auf den arteriellen Mitteldruck der Ratten sind. Die Angiotensinempfindlichkeit der Ratten wurde nicht beeinflußt. Gleich stark konzentrierte Kobalt- und Manganchloridlösungen bewirkten jeweils einen Anstieg des arteriellen Mitteldrucks nach kurzem Initialabfall und verringerten die Ansprechbarkeit der Ratten auf Angiotensin. Diese Störungen traten bei 10^{-3} m Lösungen nicht mehr auf. Bei Inkubationen mit Kobalt- und Manganchlorid wurden daher Metallchloridkonzentrationen von 5×10^{-4} m nicht überschritten.

b) Dialyse von Mischplasma

Von 180 ml heparinisierten Mischplasma (ca. 200 E Heparin/ml Vollblut) wurden 20 ml für Vergleichszwecke sofort nach Herstellung eingefroren. Daneben wurden 40 ml Mischserum gewonnen und ebenfalls eingefroren, um das Serum später mit dem Plasma vergleichen zu können.

40 ml des Mischplasmas wurden sechs Tage lang bei $2-4^{\circ}$ C gegen 1 Liter 0,9%ige NaCl-Lösung dialysiert, wobei die Dialyseflüssigkeit täglich zweimal erneuert wurde, sodaß gegen insgesamt 12 Liter dialysiert worden ist.

120 ml Plasma wurden zunächst drei Tage lang bei $2-4^{\circ}$ C gegen 10^{-3} m Na_2EDTA in 0,9%iger NaCl-Lösung dialysiert, wobei drei Liter Dialyseflüssigkeit täglich zweimal gewechselt wurden. Anschließend wurde in gleicher Weise drei Tage lang gegen reine physiologische Kochsalzlösung dialysiert, um das EDTA zusammen mit den komplex gebundenen Metallionen aus dem Dialysat zu ent-

fernen. Damit kann eine nicht auf Entzug von Metallionen beruhende Hemmung der biologischen Inaktivierung des Angiotensins durch das EDTA, wie KHAIRALLAH u. Mitarb. (19) es im sauren pH-Bereich vermuten (vgl. Seite 59), ausgeschlossen werden.

Bei einer weiteren Versuchsreihe wurde statt gegen 10^{-3} m gegen 10^{-2} m Na_2EDTA -Lösung dialysiert und wie oben angegeben weiterverfahren.

Da durch die Dialyse das Mischplasma leicht verdünnt wurde, und zwar um maximal 10 Prozent, mußten die nicht dialysierten Plasma- und Serumproben und alle weniger verdünnten Dialysate entsprechend dem durch die Dialyse am stärksten verdünnten Mischplasma verdünnt werden, um gleiche Enzymkonzentrationen zu erhalten.

Wegen dieser aus Vergleichsgründen erforderlichen Verdünnung mußten in weiteren Vorversuchen im biologischen Test an der Ratte diejenigen Inkubationszeiten ermittelt werden, in denen die Substrate A und H durch das 9+1 verdünnte, nicht dialysierte Plasma bei den in früheren Versuchen gefundenen pH-Optima zu etwa 50 Prozent inaktiviert werden. Diese Inkubationszeiten betrugen für das Substrat A bei pH 5,6 360 Minuten und bei pH 6,8 und pH 8,0 180 Minuten. Für H wurden die geeigneten Inkubationszeiten bei pH 5,6 mit 30 Minuten und bei pH 7,2 und pH 8,6 mit 15 Minuten ermittelt.

c) Hauptversuche

Bei diesen Versuchsreihen wurde nur noch bei den oben genannten, in früheren Versuchen ermittelten pH-Optima der biologischen Inaktivierung der beiden Substrate gearbeitet.

Die Ansätze für die Inkubation wurden entsprechend dem auf Seite 14 mitgeteilten Schema bereitet.

Unter 2. des Schemas wurde:

- a) das entsprechend dem Plasmadialysat verdünnte Plasma oder Serum eingesetzt, oder
- b) das gegen 0,9%ige NaCl-Lösung dialysierte Plasma, oder
- c) das entweder gegen 10^{-2} m oder 10^{-3} m Na_2EDTA -Lösung dialysierte Plasma (Tab. 14 und 15), oder
- d) 0,9%ige NaCl-Lösung für die Leerwerte eingesetzt.

Unter 4. des Schemas auf Seite 14 wurde

- a) 0,9%ige NaCl-Lösung zur Bestimmung der biologischen Inaktivierung der beiden Substrate durch die unterschiedlich behandelten Plasmaproben, oder
- b) die Chloridlösung eines zweiwertigen Metalls zur Feststellung einer möglichen Reaktivierbarkeit der durch Na_2EDTA -Dialyse bedingten Hemmung der biologischen Inaktivierung verwendet. Die verschiedenen Endkonzentrationen dieser Metallchlorid im 1 + 9 verdünnten Plasma sind den Tab. 14 und 15 auf Seite 73 und 74 zu entnehmen, die gleichzeitig die Ergebnisse wiedergeben.

Tabelle 14 zeigt den Einfluß der zweiwertigen Metallionen auf die biologische Inaktivierung durch gegen 10^{-2} m und Tabelle 15 durch gegen 10^{-3} m Na_2EDTA -Lösung dialysiertes Plasma.

Die in den Tabellen genannten Zahlen geben den Verlust an pressorischer Wirkung der inkubierten Ansätze gegenüber den nicht-inkubierten Vergleichsansätzen in Prozenten an.

d) Ergebnisse

1. Wie Tab. 15 zeigt, unterscheidet sich die biologische Inaktivierung der beiden Substrate A und H durch Serum nicht wesentlich von der durch Plasma.
2. Tab. 14 und 15 zeigen, daß beim sauren pH-Optimum die biologische Inaktivierung beider Substrate schon durch alleinige Dialyse des Plasmas gegen physiologische Kochsalzlösung vollständig gehemmt wird. Bei den anderen pH-Optima zeigt sich nur eine teilweise Hemmung nach Dialyse des Plasmas gegen 0,9%ige NaCl-Lösung.
3. Vergleicht man die biologische Inaktivierung der Angiotensine durch das gegen 10^{-3} m Na_2EDTA (Tab. 15) mit dem gegen 10^{-2} m Na_2EDTA dialysierten Plasma (Tab. 14), so findet man für beide Substrate bei pH 5,6 eine vollständige Hemmung und bei den anderen pH-Optima eine von der Konzentration des Na_2EDTA in der Dialyseflüssigkeit abhängige teilweise Hemmung. Bei 10^{-3} m Na_2EDTA -Konzentration wird die Inaktivierung beider Substrate im neutralen und alkalischen pH-Bereich partiell gehemmt, und zwar die von A stärker als die von H. Bei 10^{-2} m Na_2EDTA -Konzentration in der Dialyseflüssigkeit wird die In-

aktivierung von A bei allen pH-Optima vollständig, die Inaktivierung von H bei pH 7,2 und pH 8,6 deutlich, aber nicht vollständig gehemmt.

4. Calcium-Ionen vermögen konzentrationsabhängig die EDTA-Hemmung der Inaktivierung von H bei den pH-Optima 7,2 und 8,6 aufzuheben, nicht aber die bei pH 5,6. Die EDTA-Hemmung der Inaktivierung von A kann jedoch bei allen pH-Optima, also auch im Sauren, durch Calcium-Ionen aufgehoben werden.
5. Magnesiumchlorid hebt die EDTA-Hemmung der biologischen Inaktivierung von A nur bei pH 8,0 und von H bei pH 7,2 auf.
6. Die EDTA-Hemmung der Inaktivierung beider Substrate A und H bei pH 5,6 wird durch Zinkchlorid vollständig aufgehoben. Beim neutralen pH-Wert vermag Zinkchlorid nur die EDTA-Hemmung der Inaktivierung von H teilweise aufzuheben. Im alkalischen pH-Bereich wird der Abbau beider Substrate reaktiviert, jedoch deutlich nur bei einer Zink-Ionenkonzentration von 5×10^{-5} m.
7. Mangan-Ionen heben die EDTA-Hemmung der Inaktivierung von H bei pH 7,2 auf.
8. Cobalt-Ionen reaktivieren die durch EDTA gehemmte Inaktivierung von A bei pH 6,8 und 8,0 und von H nur bei pH 7,2.
9. Die durch Na_2EDTA -Dialyse gehemmte biologische Inaktivierung zeigt mithin für die Substrate A und H und jedem ihrer pH-Optima der Inaktivierung ein unterschiedliches Reaktivierungsmuster durch zweiwertige Metallionen (Tab. 14 und 15 auf Seite 73 und 74).

II. Versuche mit dem optischen Test

Die Durchführung dieser Versuche wurde auf den Seiten 24 bis 26 eingehend beschrieben.

Zur Erleichterung der Bewertung von Einzelergebnissen wird hier die auf Seite 44 ermittelte Signifikanzgrenze der im optischen Test gefundenen Extinktionsänderungen mitgeteilt. Sie liegt für $P = 0,05$ bei einem ΔE von 0,0196. Das heißt, daß erst Extinktionsänderungen um mehr als 0,0196 Einheiten mit 95%iger Wahrscheinlichkeit auf die Aktivität Asparagin-abspaltender Angiotensinasen zurückgeführt werden können.

Da vom Substrat A, dem Angiotensin II, nur wenige Milligramm zur Verfügung standen, und für jede Einzelbestimmung im optischen Test mehrere Milligramm benötigt werden, mußten die folgenden Versuche auf das Substrat H, das Angiotensin II-Amid (Hypertensin^R) beschränkt werden, so daß lediglich die Asparaginabspaltung von H mit der biologischen Inaktivierung des gleichen Substrats verglichen werden konnte.

1. Versuche mit Veronalpuffer

Bei den ersten Versuchen wurde mit Veronalpuffer zur Einstellung der pH-Werte gearbeitet. Der Veronalpuffer kann jedoch im biologischen Test wegen seiner toxischen Wirkung auf die Ratten nicht verwendet werden. Er gestattet aber Untersuchungen über einen breiteren pH-Bereich als der beim biologischen Test verwendete Trismaleatpuffer. Die Pufferlösungen wurden entsprechend den Angaben in DOCUMENTA GEIGY, Wissenschaftliche Tabellen (43) unter pH-Meterkontrolle bereitet.

3,75 mg H in 1,5 ml Pufferlösung des zur Einstellung aus den Wertetabellen ersichtlichen pH-Werts wurden mit 0,5 ml auf pH 7,0 eingestellten Mischplasma eine Stunde bei 37° C inkubiert und wie auf Seite 26 angegeben im optischen Test auf die Asparaginabspaltung hin untersucht. Für einige pH-Werte wurden Leerwerte, die statt Mischplasma physiologische Kochsalzlösung enthielten, mitinkubiert, um eine mögliche Spontanhydrolyse festzustellen.

pH-Wert	4,0	5,0	5,5	6,0	6,4	6,8	7,2	7,6
E ₁ korr.	0,686	0,639	0,695	0,643	0,681	0,679	0,661	0,686
E ₂	0,653	0,540	0,605	0,564	0,592	0,590	0,570	0,602
E ₁ -E ₂	0,033	0,099	0,090	0,079	0,089	0,089	0,091	0,084
pH-Wert	8,0	8,5	9,0	9,4	Leerwerte			
E ₁ korr.	0,617	0,627	0,720	0,695	0,691	0,657	0,602	
E ₂	0,553	0,540	0,635	0,532	0,680	0,650	0,485	
E ₁ -E ₂	0,064	0,087	0,085	0,163	0,011	0,007	0,117	

Analog wurde bei ausgewählten pH-Werten noch einmal inkubiert

- a) ohne Zusätze wie oben
- b) mit Na₂EDTA in 10⁻² m Endkonzentration
- c) mit Calciumchlorid in 10⁻² m Endkonzentration.

Dabei wurden folgende Werte ermittelt:

für a)	pH-Wert	5,0	6,4	7,6	8,5
	E ₁ korr.	0,666	0,644	0,686	0,660
	E ₂	0,542	0,532	0,572	0,564
	E ₁ -E ₂	0,124	0,112	0,114	0,096
für b)	E ₁ korr.	0,669	0,610	0,619	0,658
	E ₂	0,638	0,530	0,513	0,568
	E ₁ -E ₂	0,031	0,080	0,106	0,090
für c)	E ₁ korr.	0,784	0,700	0,784	0,730
	E ₂	0,685	0,595	0,687	0,630
	E ₁ -E ₂	0,099	0,105	0,097	0,100

Daraus ergeben sich für die einzelnen pH-Werte (Reihenfolge wie oben) folgende Differenzen der Extinktionsänderungen zwischen

- a) und b) -0,093 -0,032 -0,008 -0,006
- a) und c) -0,025 -0,007 -0,011 +0,004

Danach zeigt sich, daß die Asparaginabspaltung von H nur im sauren pH-Bereich durch Na₂EDTA deutlich gehemmt wird, und Calcium-Ionen keinen wesentlichen Einfluß auf die Asparaginabspaltung haben.

2. Versuche mit Trismaleatpuffer

Die oben unter II.1. genannten Versuche wurden in gleicher Weise mit Trismaleat- bzw ab pH 8,5 weiter zum Alkalischen mit Tris-HCl-Puffer wiederholt. Diesmal wurden für jeden pH-Wert zwei Ansätze inkubiert, sodaß eine Doppelbestimmung durchgeführt werden konnte.

Im Folgenden werden nur noch die Extinktionsdifferenzen (E_1 kor. - $E_2 = \Delta E$) als Ergebnisse mitgeteilt.

pH-Wert	5,2	5,6	6,0	6,4	6,8	7,2	7,6
ΔE 1. Ansatz	0,076	0,097	0,120	0,096	0,107	0,116	0,096
ΔE 2. Ansatz	0,081	0,101	0,108	0,106	0,112	0,109	0,091
Mittelwert	0,079	0,099	0,114	0,101	0,110	0,113	0,094
Leerwert	0,026			0,019			0,004

pH-Wert	8,0	8,5	Tris-HCl-Puffer:		8,5	9,0
ΔE 1. Ansatz	0,076	0,106			0,110	0,131
ΔE 2. Ansatz	0,090	0,115			0,116	0,122
Mittelwert	0,083	0,111			0,113	0,128
Leerwert	0,018	0,008			0,000	0,000

Bei ausgewählten pH-Werten wurde unter folgenden Bedingungen erneut inkubiert:

- ohne Zusatz wie oben
- mit Na_2EDTA in 10^{-2} m Endkonzentration
- mit CaCl_2 in 10^{-2} m Endkonzentration

Dabei wurden folgende Extinktionsdifferenzen ermittelt:

pH-Wert	5,2	6,0	6,4	7,2	8,0	9,0
für a)	0,077	0,097	0,109	0,092	0,080	0,107
für b)	0,021	0,071	0,091	0,091	0,096	0,092
für c)	-	0,099	0,110	0,095	0,099	0,104

Die Differenzen der Extinctionsänderungen betragen zwischen

a) und b)	0,056	0,026	0,018	0,001	0,016	0,015
a) und c)	-	0,002	0,001	0,003	0,019	0,003

Wie bei den Versuchen mit Veronalpuffer zeigt sich nur im sauren pH-Bereich eine Hemmung der Asparaginabspaltung von H durch Na_2EDTA . Calcium-Ionen haben keinen Einfluß auf die Asparaginabspaltung.

3. Bestimmung der pH-Optimumkurve der Asparaginabspaltung aus Angiotensin II-Amid in Trismaleatpuffer

In einer weiteren Versuchsreihe mit Trismaleatpuffer wurden die Abstände der pH-Werte, bei denen die Asparaginabspaltung aus H bestimmt wurde, auf 0,2 pH-Einheiten verkürzt. Außerdem wurde die Substratmenge pro Ansatz auf 1,635 mg Hypertensin^R reduziert. Zu jedem pH-Wert wurden zwei Ansätze bereitet und außerdem ein Leerwert, der statt Plasma 0,9%ige NaCl-Lösung enthielt, mitinkubiert.

Es wurden folgende Extinktionsänderungen gemessen:

pH-Wert	5,2	5,4	5,6	5,8	6,0	6,2	6,4	6,6	6,8
ΔE_1	0,044	0,029	0,055	0,057	0,076	0,081	0,080	0,076	0,056
ΔE_2	0,032	0,055	0,058	-	0,067	0,075	0,075	0,075	0,060
Leerw.	0,001	0,002	0,003	0,003	0,002	-	0,000	-	0,000
Mittelwert	0,038	0,042	0,057	0,057	0,072	0,078	0,076	0,076	0,058

pH-Wert	7,0	7,2	7,4	7,6	7,8	8,0	8,3	8,6
ΔE_1	0,068	0,080	0,072	0,062	0,047	0,053	0,086	0,098
ΔE_2	0,068	0,085	0,079	0,074	0,069	0,054	0,080	0,089
Leerw.	0,001	0,000	-	0,004	-	0,003	0,001	0,003
Mittelwert	0,068	0,083	0,075	0,068	0,058	0,054	0,083	0,094

Die aus diesen Werten resultierende graphische Darstellung der pH-Optimumkurve der Asparaginabspaltung aus H wird in Abb. 9 auf Seite 88 der pH-Optimumkurve der biologischen Inaktivierung des gleichen Substrats gegenübergestellt.

Die pH-Optimumkurve der Asparaginabspaltung aus H durch die Aminopeptidasen des Plasmas zeigt ein pH-Optimum bei pH 6,2 bis pH 6,4 und ein weiteres, nicht scharf gegen das letztere abgegrenztes Optimum bei pH 7,2, das mit dem der biologischen Inaktivierung des gleichen Substrats übereinstimmt. Ebenfalls mit der biologischen Inaktivierung übereinstimmend nimmt die Aminopeptidaseaktivität jenseits von pH 8,0 zum Alkalischen hin wieder zu.

Auf Hemmungs- und Reaktivierungsversuche zur Asparaginabspaltung aus H in gleichem Rahmen wie zur biologischen Inaktivierung wurde verzichtet, da befürchtet werden mußte, daß Änderungen der Ionenkonzentrationen zu schwer überschaubaren Störungen des beim optischen Test verwendeten Enzymsystems führen. Eine hier nicht wiedergegebene Versuchsreihe zur Feststellung der Reaktivierbarkeit der durch Na_2EDTA gehemmten Aminopeptidasen erwies sich als nicht reproduzierbar. Die Zugabe von Na_2EDTA soll jedoch das Enzymsystem nicht beeinflussen (Persönliche Mitteilung von W. OELKERS nach Untersuchungen von I.U.v.GOLDACKER).

III. Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Mit dem biologischen Test ermittelte Ergebnisse

1. Die biologische Inaktivierung von Angiotensin II (A) und Angiotensin II-Amid (H) durch Humanserum zeigt im Vergleich zur Inaktivierung durch Humanplasma keinen wesentlichen Unterschied in Hinblick auf die Inaktivierungsgeschwindigkeit und ihre pH-Optima
2. Bei allen gefundenen pH-Optima wird Angiotensin II-Amid in vitro zwölfmal schneller inaktiviert als Angiotensin II.
3. Die biologische Inaktivierung der Substrate A und H zeigt in dem von pH 5,2 bis pH 8,6 untersuchten pH-Bereich jeweils drei pH-Optima. Sie liegen für A bei pH 5,6; 6,8 und zwischen pH 7,6 und 8,0. Für H liegen sie bei pH 5,6; 7,2 und jenseits von pH 8,6 im Alkalischen. Nur im Säuren ist das pH-Optimum für beide Substrate gleich.
4. Calcium, in 10^{-3} m Konzentration allein dem Inkubationsgemisch zugesetzt, hat keinen Einfluß auf die biologische Inaktivierung von A, hemmt jedoch teilweise die Inaktivierung von H im Alkalischen.
5. Na_2EDTA in 10^{-3} m Konzentration hemmt die biologische Inaktivierung von A und H im Säuren und von A auch im Alkalischen, während es im Neutralen bei beiden Substraten und im Alkalischen auch bei H ohne Einfluß auf die Inaktivierung ist.
6. Die Hemmung der biologischen Inaktivierung der Substrate A und H im Säuren durch Na_2EDTA kann mit CaCl_2 in doppeltem Überschuß gegenüber Na_2EDTA nicht aufgehoben werden. Im Alkalischen hingegen ist die bei dem Substrat A gefundene EDTA-Hemmung der Inaktivierung durch CaCl_2 aufhebbar.
7. Dialyse des Plasmas gegen physiologische Kochsalzlösung führt zu einer vollständigen Hemmung der biologischen Inaktivierung beider Substrate bei pH 5,6. Bei den anderen pH-Optima wird die biologische Inaktivierung beider Substrate durch Dialyse gegen 0,9%ige NaCl-Lösung nur teilweise gehemmt.

8. Nach Dialyse von Plasma gegen 10^{-2} m Na_2EDTA -Lösung ist die biologische Inaktivierung des Substrats A bei allen pH-Optima vollständig gehemmt. Bei dem Substrat II findet sich eine vollständige Hemmung im Sauren und eine starke, aber nicht vollständige Hemmung bei pH 7,2 und pH 8,6.
9. Die Hemmung der Plasma-Angiotensinasen nach Dialyse gegen Na_2EDTA wird durch verschiedene zweiwertige Metallionen völlig oder teilweise aufgehoben. Siehe hierzu Tabelle 14 auf Seite 73.

2. Versuche mit dem optischen Test

1. Die pH-Optimumkurve der Asparaginabspaltung von H durch Aminopeptidasen zeigt bei Verwendung von Trismaleat- bzw. Tris-HCl-Puffer im pH-Bereich von pH 5,2 bis pH 8,6 ein pH-Optimum bei pH 6,2 bis pH 6,4 und ein weiteres, nicht scharf abgesetztes Optimum bei pH 7,2 und einen erneuten Aktivitätsanstieg jenseits von pH 8,0, dessen Maximum mit dem Tris-HCl-Puffer nicht ermittelt werden konnte.
2. Eine Hemmung durch Na_2EDTA in 10^{-2} m Konzentration im Inkubationsgemisch fand sich nur im sauren pH-Bereich.

D. GENAUIGKEIT DER METHODEN

I. Genauigkeit des biologischen Tests

Für alle Fehlerrechnungen wurden willkürlich 31 Doppelbestimmungen herausgegriffen, da bei 30 Freiheitsgraden die Signifikanzschranke für $P = 0,05$ ziemlich genau der Summe von zweifacher Standardabweichung und mittlerer Differenz der Doppelbestimmungen entspricht (44).

Die Standardabweichung wurde nach der Formel

$$S_D = \sqrt{\frac{x^2 - (\sum x)^2/N}{N-1}} \quad \text{errechnet.}$$

1. In Tab. 16 wurden aus den Tab. 1 bis 13 die Mengen von A bzw. H in Nanogramm miteinander verglichen, die bei Testung desselben Ansatzes an zwei Ratten gefunden worden sind.

In Tab. 16 bedeuten:

N = Nummer der Testpaare

T_1 = an 1. Ratte ermittelte Angiotensinmenge

T_2 = an 2. Ratte ermittelte Angiotensinmenge

$D = T_1 - T_2$

Wie aus Tab. 16 auf Seite 75 ersichtlich ist, ergibt sich bei Testung desselben Ansatzes an zwei Ratten eine mittlere Differenz der Doppelbestimmungen (Mw_D) von 0,81 ng mit einer Standardabweichung von $\pm 0,714$ ng.

In diese Standardabweichung der mittleren Differenz der Doppelbestimmungen derselben Ansätze an zwei Ratten gehen folgende Fehlerquellen ein:

- a) die unterschiedliche Angiotensinempfindlichkeit der Ratten,
- b) die unterschiedliche Lagerungsdauer der Ansätze,
- c) unterschiedliche Injektionsmengen und Injektionsgeschwindigkeiten.

2. In analoger Weise wurde in Tab. 17 die Standardabweichung in Nanogramm Angiotensin ermittelt, die sich ergibt, wenn die Inkubation unter gleichen Bedingungen wiederholt und jede Probe an einer anderen Ratte getestet worden ist.

In Tab. 17 bedeuten:

I_1 = Angiotensinmenge bei 1. Inkubation

I_2 = Angiotensinmenge bei 2. Inkubation

Hier ergibt sich eine mittlere Differenz der Doppelbestimmungen von 1,56 ng mit einer Standardabweichung von $\pm 1,35$ ng.

In diese Fehlerrechnung gehen folgende Fehlerquellen ein:

- a) unterschiedliche Angiotensinempfindlichkeit der Ratten,
- b) unterschiedliche Lagerungszeiten der Proben
- c) unterschiedliche Injektionsmengen und Injektionsgeschwindigkeiten,
- d) Pipettierfehler, und
- e) Abweichungen der Inkubationsbedingungen wie Zeit, Temperatur und Konzentration der verwendeten Lösungen.

Wie weiter oben ermittelt, bedingen die Fehlerquellen a) bis c) für sich zusammen eine mittlere Differenz der Doppelbestimmungen von $0,81 \pm 0,714$ ng. Durch die zusätzlichen Fehlerquellen d) und e) werden beide Werte (mittlere Differenz und S_D) fast verdoppelt.

3. In Tab. 18 sind die Werte gegenübergestellt, die resultieren, wenn zwei unter gleichen Bedingungen inkubierte Ansätze an derselben Ratte getestet worden sind.

Hier ergibt sich eine mittlere Differenz der Doppelbestimmungen von 0,70 ng mit einer Standardabweichung von $\pm 0,61$ ng.

Die Fehlerquellen sind:

- a) Änderung der Angiotensinempfindlichkeit der Ratte zwischen den beiden Tests,
- b) Pipettierfehler,
- c) Abweichungen der Inkubationsbedingungen
- d) Unterschiedliche Injektionsmengen und Injektionsgeschwindigkeiten.

Die im Vergleich zu 2. um mehr als die Hälfte niedrigere mittlere Differenz der Doppelbestimmungen und Standardabweichung zeigen, daß die größte Fehlerquelle in der unterschiedlichen Angiotensinempfindlichkeit der Ratten liegt. Die Angiotensinempfindlichkeit zweier Ratten untereinander variiert erheblich stärker als die bei einer Ratte allein während einer Testperiode.

Entsprechend den unter 2. genannten Bedingungen spricht erst ein Substratverlust von mehr als 4,26 ng, das sind 21,3% der eingesetzten Substratmenge von 20 ng, mit 95%iger Wahrschein-

lichkeit für die Aktivität von Angiotensinasen. Denn $P=0,05$ gilt für einen Wert der größer ist als die Summe von mittlerer Differenz der Doppelbestimmungen und der doppelten Standardabweichung ($Mw_D + 2 \times S_D$).

Die bisherigen Fehlerrechnungen zeigen die Reproduzierbarkeit des biologischen Tests in absoluten Werten. Sie sind jedoch nicht ganz relevant, da bei der biologischen Testung die inkubierten Ansätze immer mit den dazugehörenden, nichtinkubierten, als Null- bzw. Ausgangswert dienenden Ansätzen, die die gleiche Zusammensetzung hatten, verglichen wurden. Wie auf Seite 15 beschrieben, wurden 5 ml Inkubationsgemisch zusammenpipettiert und nach Durchmischung je die Hälfte für den Nullwert und den Zeitwert der Inkubation verwendet. Damit sind Pipettierfehler innerhalb der zusammengehörenden Ansätze (Null- und Zeitwert) eliminiert.

4. In Tab. 19 wurden die Differenzen von Doppelbestimmungen der biologischen Inaktivierung des Angiotensins, gemessen in Prozent Abbau, ermittelt, die resultieren, wenn die jeweils zu einem pH-Wert gehörenden Ansätze (Null- und Zeitwert der Inkubation) an zwei Ratten getestet worden sind.

Dabei ergibt sich eine mittlere Differenz der Doppelbestimmungen von 3,88% Inaktivierung mit einer Standardabweichung von ~~3~~3,08% Inaktivierung. Die Fehlerquellen entsprechen den unter 1. genannten.

5. Werden die Inaktivierungsraten von zwei unter gleichen Bedingungen durchgeführten Inkubationen, die an verschiedenem Ratten ermittelt wurden, verglichen, ergeben sich die in Tab. 20 dargestellten Differenzen. Die mittlere Differenz der Doppelbestimmungen beträgt 4,68% Inaktivierung mit einer Standardabweichung von ~~4~~4,12% Inaktivierung. Die Fehlerquellen entsprechen den unter 2. genannten.

$P=0,05$ gilt für einen Wert der größer ist als $Mw_D + 2 \times S_D = 4,68 + 2 \times 4,12 = 12,92\%$ Inaktivierung.

Somit sind Inaktivierungsraten von mehr als 13% mit 95%iger Wahrscheinlichkeit für einen Wirkungsverlust des Angiotensins durch Abbau signifikant. Dieser Wert wird bei 31 Versuchspaa- ren in Tab. 20 nur einmal überschritten, d. h. in 3,2 % der Fälle.

Einen optischen Eindruck von der Reproduzierbarkeit der im biologischen Test ermittelten Ergebnisse geben die Abb. 4 und 5 auf Seite 83 und 84, in denen jeweils die Ergebnisse zweier Inkubationsreihen mit je zwei Testreihen graphisch dargestellt sind.

II. Genauigkeit des optischen Tests

In Tab. 21 wurden aus den Wertetabellen zum optischen Test (S. 36 und 37) willkürlich ausgewählte Doppelbestimmungen der Extinktionsänderungen verglichen, die von je zwei unter gleichen Bedingungen inkubierten Ansätzen stammen.

Die mittlere Differenz der Doppelbestimmungen beträgt 0,00792 Extinktionseinheiten mit einer Standardabweichung von $\pm 0,00584$ Extinktionseinheiten. Dies bedeutet entsprechend dem unter D.I.5. Gesagten, daß erst Differenzen von mehr als 0,0196 Extinktionseinheiten innerhalb der pH-Optimumkurve mit 95%iger Wahrscheinlichkeit durch unterschiedliche Geschwindigkeiten der Asparaginabspaltung aus Angiotensin II-Amid bedingt sind.

Diese relativ große Fehlerbreite ist bedingt durch die Vielzahl von Einzelschritten beim optischen Test. Die größte Fehlerquelle ist in der Neutralisation nach Fällung der Plasmaproteine im ersten Schritt vor dem eigentlichen optischen Test (S. 25) zu suchen. Die Neutralisation erfolgte gegen Indikatorpapier, da ein Mikro-pH-Meter nicht zur Verfügung stand. Außerdem wurden wegen der unterschiedlichen pH-Werte der Ausgangslösungen vor dem Fällen der Proteine auch unterschiedliche Mengen 5 n KOH zur Neutralisation gebraucht. Dies hatte geringe Verschiebungen der Substratkonzentrationen bei den verschiedenen pH-Werten zur Folge.

E. DISKUSSION

I. Zu den unterschiedlichen Ergebnissen anderer Autoren

Die Ergebnisse der vorliegende Arbeit wurden im Teil C., Abschnitt III. (S. 39 und 40) zusammengefaßt. Bei einem Vergleich der Ergebnisse früherer Untersucher fallen zahlreiche voneinander abweichende Angaben über Substratspezifität, Hemmbarkeit und Reaktivierbarkeit Angiotensin-spaltender Enzyme des Plasmas auf, die sich zum Teil sogar widersprechen. Die zwar zahlreichen, aber oft voneinander abweichenden Einzelbefunde über Eigenschaften der Angiotensinasen waren der Anlaß, die Inaktivierung von Angiotensin II (A) und Angiotensin II-Amid (H) sowie die Abhängigkeit des Abbaus beider Substrate von der Konzentration verschiedener zweiwertiger Metallionen über einen größeren pH-Bereich unter sonst gleichen Standardbedingungen vergleichend zu untersuchen.

Ein Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung mit denen anderer Autoren ist nur schwer möglich. Viele Autoren haben andere Methoden zur Messung des Angiotensinabbaus benutzt. KLAUS u. Mitarb. (14) und NAGATSU u. Mitarb. (16) haben z. B. den Abbau des Angiotensins chromatographisch über freigesetzte Aminosäuren bestimmt. Daß eine andere Methode zu zum Teil anderen Ergebnissen führt, zeigt auch der Vergleich der in der vorliegenden Arbeit mit dem optischen Test gewonnenen Ergebnisse mit denen, die mit dem biologischen Test ermittelt worden sind. Darauf wird im folgenden Abschnitt II. noch genauer eingegangen.

Aber auch die Versuchsbedingungen der Autoren, die mit dem biologischen Test gearbeitet haben, unterscheiden sich alle mehr oder weniger voneinander. Die Unterschiede betreffen die Konzentrationen des Enzyms, des Substrats, der verwendeten Inhibitoren und Reaktivatoren, ferner die verwendeten Puffer, die Inkubationszeiten und nicht zuletzt die pH-Werte, bei denen die Untersuchungen durchgeführt wurden. Diese Arbeit zeigt, daß gerade der pH-Wert die Ergebnisse stark beeinflusst. Im nachfolgenden Abschnitt II. wird anhand der Ergebnisse dieser Arbeit gezeigt, daß schon geringe Änderungen der Inkubationsbedingungen, z.B. allein die Verwendung eines anderen Puffers, zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Im Abschnitt VII. der

Diskussion wird darauf hingewiesen, daß auch die Inkubationszeit die Ergebnisse beeinflusst.

Nach dem oben Gesagten ist es wenig sinnvoll, alle unter so unterschiedlichen Methoden und Versuchsbedingungen gewonnenen Ergebnisse anderer Autoren den eigenen gegenüberzustellen und zu diskutieren.

II. Zu voneinander abweichenden Ergebnissen in der vorliegenden Arbeit

Einige Ergebnisse dieser Arbeit sind widersprüchlich, deshalb soll vor der weiteren Diskussion darauf eingegangen werden.

1. Bei den Versuchen mit gegen Na_2EDTA dialysiertem Plasma fand sich eine Reaktivierung des Abbaus von A bei pH 5,6 durch Calcium-Ionen (Tab. 14), während die bei direktem Zusatz von Na_2EDTA zum Inkubationsgemisch resultierende Hemmung der biologischen Inaktivierung von A im Säuren durch CaCl_2 in doppeltem Überschuß nicht aufgehoben wurde (Abb. 7),

Eine mögliche Erklärung liegt in den Unterschieden der Methode. Während bei dem ersten Versuch das EDTA durch anschließende Dialyse gegen physiologische Kochsalzlösung (s. S. 30 und 31) entfernt worden war, befand sich das EDTA bei dem letzten Versuch noch im Inkubationsgemisch. Bei dem ersten Versuch ist eine Beeinflussung der biologischen Inaktivierung durch Na_2EDTA , die nicht auf Ionenentzug durch Chelatbildung beruht, ausgeschlossen. Daher sind die Reaktivierungsversuche mit dem dialysierten Plasma zuverlässiger als die, bei denen das EDTA noch im Inkubationsgemisch verblieben ist.

Die Anwesenheit von EDTA im Inkubationsgemisch ist bei den Reaktivierungsversuchen auch in anderer Hinsicht störend. Der Vergleich der Stabilitätskonstanten der verschiedenen Chelatkomplexe des EDTA mit zweiwertigen Metallionen, die von CHABAREK und MARTELL (45) in Abhängigkeit vom pH-Wert in 100%igem Überschuß des Na_2EDTA zur Metallionenausgangskonzentration ermittelt wurden und in Abbildung 10 auf Seite 89 graphisch dargestellt worden sind, zeigt, daß die Stabilität der Metall-Chelatkomplexe in folgender Reihenfolge zunimmt: Magnesium, Calcium, Mangan, Cobalt, Zink.

Danach ist es möglich, daß in Anwesenheit von EDTA im Inkubationsgemisch bei Zugabe von Zink-Ionen im Überschuß eine beobachtete Reaktivierung des Angiotensinabbaus nicht nur durch die Zink-Ionen bedingt ist. Da das EDTA vorher auch andere zweiwertige Metallionen des Plasmas an sich gebunden hat, und das Zink-Ion mit dem EDTA den stabilsten Chelatkomplex bildet, verdrängt es bei seinem Zusatz die Ionen, deren Chelatkomplex mit dem EDTA weniger stabil ist, z. B. vorher gebundene Calcium-Ionen. D. h. die bei Zugabe von Zink-Ionen beobachtete Reaktivierung des Angiotensinabbaus kann ebenso durch die vom EDTA freigesetzten Calcium-Ionen bedingt sein. Diese Quelle für Interpretationsfehler entfällt, wenn das EDTA vor der Inkubation aus dem Plasma durch Dialyse gegen physiologische Kochsalzlösung entfernt wird.

Der hier erwähnte Vergleich der Stabilitätskonstanten der Chelatkomplexe des EDTA mit den verschiedenen zweiwertigen Metallionen war, wie auf Seite 18 bereits erwähnt, auch der Anlaß, weitere zweiwertige Metallionen neben dem Calcium zu den Reaktivierungsversuchen heranzuziehen, zumal sich durch Calciumzusatz in doppeltem Überschuß zum EDTA nur in einem Fall eine Reaktivierung des durch EDTA-Zugabe zum Inkubationsgemisch gehemmten Angiotensinabbaus erreichen ließ.

2. Wurde das Na_2EDTA in 10^{-3} m Konzentration direkt dem Inkubationsgemisch zugesetzt, blieb eine Hemmung der biologischen Inaktivierung von A im neutralen und von H im neutralen und alkalischen pH-Bereich aus, während nach Dialyse des Plasmas gegen 10^{-2} m Na_2EDTA -Lösung in allen pH-Bereichen und bei beiden Substraten eine Hemmung gefunden wurde (Abb. 7 u. 8, Tab. 14).

Danach war die Na_2EDTA -Konzentration im Inkubationsgemisch bei den genannten pH-Bereichen für eine Hemmung der biologischen Inaktivierung unzureichend. Das läßt sich am besten mit einer Konkurrenz des Komplexbildners und der Plasmaproteine um die Metallionen mit relativ geringer Affinität zum Komplexbildner (Ca^{++} und Mn^{++}) erklären.

Ähnlich kann die unzureichende Hemmung der Angiotensinasen nach Dialyse gegen nur 10^{-3} m Na_2EDTA -Lösung (Tab. 15) erklärt werden.

Auch die bei dem optischen Test im neutralen und alkalischen pH-Bereich unter Zusatz von Na_2EDTA in 10^{-2} m Konzentration ausgebliebene Hemmung der Asparaginabspaltung von H kann derart erklärt werden.

3. Bei den Versuchen mit dem optischen Test fand sich unter Verwendung von Veronal- anstelle von Trismaleatpuffer eine Verschiebung des pH-Optimums im Sauren um 1,2 pH-Einheiten von pH 6,2 bei Trismaleatpuffer nach pH 5,0 bei Veronalpuffer (Abb. 9 auf S. 88 und Tabelle auf Seite 35 oben).

Eine Verschiebung des pH-Optimums bei Verwendung eines anderen Puffers unter sonst gleichen Inkubationsbedingungen haben auch KLAUS u. Mitarb. (14) beobachtet. Mit ihrer papierchromatographischen Methode fanden sie das pH-Optimum der Valin-Freisetzung aus H unter Verwendung von Tris-Puffer bei pH 7,0 und unter Verwendung von Phosphatpuffer bei pH 6,5. Diese Abhängigkeit der pH-Optima von der Art des verwendeten Puffers erklärt einen Teil der unterschiedlichen Angaben über pH-Optima der Angiotensinasen.

4. Mit dem biologischen Test wurde unter Verwendung von Trismaleatpuffer zum Einstellen der pH-Werte das pH-Optimum der Inaktivierung von H im Sauren bei pH 5,6 gefunden. Es liegt also zwischen den mit dem optischen Test in Veronal- und Trismaleatpuffer ermittelten Optima von pH 5,0 und pH 6,2. Es ist unklar, ob die mit dem optischen Test im Sauren ermittelten pH-Optima durch das gleiche Enzym bedingt sind, das beim biologischen Test zu einem Aktivitätsmaximum bei pH 5,6 führt. Die Differenz kann mit Unterschieden der Methoden erklärt werden. Auf dieses Problem wird im Abschnitt VIII., 1. auf Seite 58 noch weiter eingegangen.

III. Zur Rolle der Aminopeptidasen als Angiotensinasen

Angiotensinasen sind Peptidasen, die Angiotensin inaktivieren. Grundsätzlich können dies Amino-, Carboxy- und Endopeptidasen sein (6).

REGOLI u. Mitarb. (12) haben anhand chromatographischer Untersuchungen zeigen können, daß beim Abbau des Angiotensins durch Plasma Carboxypeptidasen ohne Bedeutung sind.

In derselben Arbeit berichten REGOLI u. Mitarb. über das Auftreten des Tetrapeptids Asp-Arg-Val-Tyr unter den Spaltprodukten des Angiotensins nach der Inkubation mit Plasma. Sie führten dies auf die Aktivität einer chymotrypsinähnlichen Endopeptidase, wie sie von RINIKER (6) beschrieben worden ist, zurück. Nach ihren Untersuchungen erfolgt der Abbau des Angiotensins durch die chymotrypsinähnliche Endopeptidase jedoch wesentlich langsamer als durch die Aminopeptidasen. Für die untergeordnete Rolle dieses Enzyms spricht auch, daß das zweite sich bei der Spaltung des Angiotensins durch die chymotrypsinähnliche Endopeptidase ergebende Tetrapeptid Val-His-Pro-Phe von den Autoren nicht nachgewiesen werden konnte. Bei den Endopeptidasen muß noch ein trypsinähnliches Enzym erwähnt werden, das vom Angiotensin das Dipeptid Asp-Arg abspaltet (6,14). NAGATSU u. Mitarb. (16) schlossen aus der Beobachtung, daß dieses Dipeptid Asp-Arg chromatographisch nicht nachgewiesen werden konnte, und Serum das Testsubstrat für Trypsin und trypsinähnliche Enzyme, das Benzoyl-DL-Arginin- β -Naphthylamid, nicht hydrolysiert, auf das Fehlen dieses Enzyms in normalem menschlichen Serum.

KLAUS u. Mitarb. (14) fanden, daß die Abspaltung der N-terminalen Aminosäure des Angiotensins der die Geschwindigkeit des Angiotensinabbaus bestimmende Schritt ist.

Alle hier zitierten Befunde sprechen dafür, daß im Plasma Aminopeptidasen die entscheidende Rolle bei der Inaktivierung des Angiotensins spielen. Dies gilt jedoch nur für den neutralen pH-Bereich, in dem die oben zitierten Befunde erhoben worden sind.

Aufgrund der bei unseren Untersuchungen gefundenen Übereinstimmung der pH-Optima der biologischen Inaktivierung von H mit

den im optischen Test ermittelten pH-Optima der Asparaginabspaltung von H kann die letzte Aussage für das Substrat H im Neutralen bestätigt und auf den sauren und alkalischen pH-Bereich ausgedehnt werden. Denn mit dem optischen Test wird unter der Voraussetzung, daß die Abspaltung der N-terminalen Aminosäure der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Angiotensinabbaus ist, spezifisch die Aminopeptidase-Aktivität gemessen. Die erwähnte Voraussetzung ist von KLAUS u. Mitarb. (14) zwar nur für den neutralen pH-Bereich belegt worden, aber allein schon die im Sauren weitgehende und im Alkalischen genaue Übereinstimmung der mit den beiden Methoden gefundenen pH-Optima macht es wahrscheinlich, daß auch in diesen pH-Bereichen Aminopeptidasen die entscheidende Rolle beim Abbau des Angiotensin II-Amids spielen.

Da das Substrat A nur durch das Fehlen einer Amidgruppe an der N-terminalen Aminosäure vom Substrat H unterschieden ist, kann vermutet werden, daß auch dieses Substrat im Wesentlichen durch Aminopeptidasen inaktiviert wird. Einen Hinweis dafür liefert der Befund, daß bei allen einander entsprechenden pH-Optima der biologischen Inaktivierung von A und H das Substrat A um denselben Faktor 12 langsamer inaktiviert wird als H.

Bei unseren Versuchen wurden nur Angiotensine mit Valin in Stellung 5 der Aminosäuresequenz verwendet. Die Tatsache, daß beim menschlichen Angiotensin in Stellung 5 der Aminosäuresequenz Isoleucin gefunden wurde (10), dürfte im neutralen pH-Bereich keinen wesentlichen Unterschied im Abbaumodus durch Aminopeptidasen erwarten lassen, da hier die Abbaugeschwindigkeit nur durch Änderungen der N-terminalen Aminosäure und deren Struktur beeinflusst wird (12,14). Denkbar ist allerdings eine veränderte Affinität zu einem chymotrypsinähnlichen Enzym, da an der von ihm zu spaltenden Peptidbindung zwischen C⁴ und C⁵ eine andere Aminosäure beteiligt ist.

IV. Zur Substratspezifität der Plasmaangiotensinasen

Nachdem im vorangegangenen Abschnitt III. darauf hingewiesen wurde, daß die biologische Inaktivierung des Angiotensins durch menschliches Plasma im wesentlichen auf Aminopeptidasen zurückgeführt werden kann, stellt sich die Frage nach der Substratspezifität dieser Enzyme.

Für eine direkte Beantwortung dieser Frage sind die durchgeführten Untersuchungen methodisch unzureichend, da erstens mit einem Enzymgemisch, dem Plasma, gearbeitet und zweitens nur die biologische Inaktivierung der Substrate A und H und die Asparaginabspaltung von H untersucht wurde. Die vorliegenden Ergebnisse, insbesondere der Reaktivierungsversuche nach EDTA-Hemmung lassen jedoch einen hohen Grad an Spezifität der Aminopeptidasen erwarten. Die Ergebnisse sprechen dafür, daß jedes der beiden Substrate bei jedem der ermittelten pH-Optima ihrer Inaktivierung durch eine andere Aminopeptidase inaktiviert wird, da sich die EDTA-Hemmung jeweils durch in Art und Zahl unterschiedliche zweiwertige Metallionen aufheben ließ (Tab. 14 auf S. 73).

KLAUS u. Mitarb. (14) betonten zunächst, daß die Eigenschaften der Serum-Leucinaminopeptidase (LAP) mit Ausnahme ihrer Aktivierbarkeit durch Cobalt-Ionen denen der Serum-Angiotensinase entsprechen. Später fanden jedoch KLAUS und BIRON (15) die LAP-Aktivität im Plasma Schwangerer erhöht, ohne daß dabei der Angiotensinabbau vermehrt war. Sie vermuten deshalb, daß die Angiotensinase substratspezifischer ist. KHAIRALLAH u. Mitarb. (13) machten wahrscheinlich, daß die von ihnen so genannte Angiotensinase A nicht mit der LAP identisch ist, da die LAP im Gegensatz zur Angiotensinase A durch Magnesium-Ionen aktiviert wird und Arg¹-Angiotensin II zu spalten vermag. Auch KOKUBU u. Mitarb. (46), die allerdings eine aus Erythrozytenhämolysat gewonnene Angiotensinase untersuchten, konnten zeigen, daß die Angiotensinase nicht mit der LAP identisch ist.

KLAUS (41) fand bei Untersuchungen über Aminopeptidasen des menschlichen Serums ein relativ breites pH-Optimum der LAP und vermutet deshalb die Existenz einer Reihe nicht streng substratspezifischer Aminopeptidasen, die etwas unterschiedliche pH-Optima aufweisen. Die LAP ließ sich durch EDTA voll-

ständig hemmen, durch Cobalt-Ionen vollständig und durch Magnesium- und Mangan-Ionen teilweise reaktivieren. Die Reaktivierbarkeit der LAP nach EDTA-Hemmung durch Magnesium- und Mangan-Ionen nahm mit zunehmender Reinigung des Enzyms noch weiter zu.

Der Autor vermutet auch organspezifische Leucinaminopeptidasen. Er konnte z. B. zeigen, daß die Erythrozyten-LAP nicht in allen Daten mit der aus Leukozyten gewonnenen LAP übereinstimmt.

Vergleicht man die Angaben von KLAUS (41) zur Reaktivierbarkeit der LAP mit den Ergebnissen unserer Reaktivierungsversuche mit durch EDTA gehemmten Angiotensinasen, dann erscheint es unwahrscheinlich, daß das Substrat A im sauren und das Substrat H im sauren und alkalischen pH-Bereich durch eine LAP inaktiviert werden, da hier weder Co^{++} oder Mn^{++} noch Mg^{++} die EDTA-Hemmung aufheben. In den anderen pH-Bereichen wurde jedoch eine Reaktivierung durch eines oder mehrere der genannten Metallionen beobachtet. Wegen der unterschiedlichen pH-Optima und der ebenfalls unterschiedlichen Reaktivierbarkeit der durch EDTA gehemmten biologischen Inaktivierung (z. B. für das Substrat A bei pH 6,8 durch Co^{++} und bei pH 8,0 durch Co^{++} und Mg^{++} , für das Substrat H bei pH 7,2 durch Co^{++} , Mg^{++} und Mn^{++}) müßte es sich um unterschiedliche Leucinaminopeptidasen handeln, was nach der oben zitierten Arbeit von KLAUS (41) denkbar ist.

Es fällt jedoch auf, daß bei unseren Versuchen alle Angiotensinasen, die hinsichtlich ihrer Reaktivierbarkeit durch zweiwertige Metallionen den Leucinaminopeptidasen nahe stehen, durch weitere Metallionen reaktiviert werden können, die nicht als Reaktivatoren der Leucinaminopeptidasen bekannt sind, nämlich Ca^{++} oder (und) Zn^{++} . Dies läßt eine über die Leucinaminopeptidasen hinausgehende Spezifität der Angiotensinasen vermuten. Andererseits ist, da das Plasma ein Enzymgemisch darstellt, auch nicht sicher auszuschließen, daß ein bei unseren Untersuchungen ermitteltes pH-Optimum der biologischen Inaktivierung auf die Aktivität mehrerer Enzyme, die alle Amino-peptidasen sein können, zurückgeht.

V. Zur Organ- und Gewebsspezifität der Angiotensinasen

Die Plasmaangiotensinasen sind in das Plasma emigrierte Gewebsangiotensinasen. Auf Seite 9 der Einleitung wurde darauf hingewiesen, daß die biologische Bedeutung der Plasmaangiotensinasen wahrscheinlich gering ist. Die Befunde von KLAUS u. Mitarb. (24) sowie HODGE u. Mitarb. (25) sprechen dafür, daß der größte Teil sowohl infundierten als auch in vivo gebildeten Angiotensins in Organen wie Leber, Niere und Muskulatur oder auch in der Nähe der Rezeptoren in der Gefäßwand abgebaut wird.

ITZKOVITZ und MILLER (42) fanden in folgenden aus Rattenorganen gewonnenen Gewebshomogenaten beachtliche Angiotensinaseaktivitäten: Lunge, Leber, Niere, Darm und Erythrozytenhaemolysat. Die Aktivitäten nahmen in der angegebenen Reihenfolge zu. Die aus diesen Geweben gewonnenen Angiotensinasen zeigten eine unterschiedliche Hemmbarkeit durch 2×10^{-2} m Hg^{++} und 4×10^{-2} m EACA (Epsilon-Aminocapronsäure). Diese Befunde deuten auf eine Organspezifität der Angiotensinasen. In diesem Zusammenhang stellt sich in Hinblick auf die durch die vorliegende Arbeit bestätigte Heterogenität der Plasmaangiotensinasen die Frage, inwieweit die Plasmaangiotensinasen bestimmten Organangiotensinasen zugeordnet werden können.

Mit Ausnahme der Erythrozytenangiotensinase liegen vergleichbare Untersuchungen anderer Organangiotensinasen nicht vor. KHAIRALLAH u. Mitarb. (13) ermittelten identische Eigenschaften für die Plasma- und Erythrozytenangiotensinase. KOKUBU u. Mitarb. (46) kamen bei ihren Untersuchungen mit durch Säulenchromatographie teilweise gereinigtem Haemolysat aus menschlichen Erythrozyten an dem Substrat H zu Ergebnissen, die sich unter Berücksichtigung methodischer Unterschiede mit denen von KHAIRALLAH u. Mitarb. (13) decken. Das pH-Optimum der biologischen Inaktivierung von H lag bei pH 6,5 bis pH 7,6. Bei pH 6,8 fanden sie eine vollständige Hemmung der Inaktivierung durch 10^{-3} m Na_2EDTA , die durch 3×10^{-3} m Co^{++} und Mn^{++} vollständig und durch Ca^{++} teilweise aufgehoben werden konnte. Mg^{++} , Na^+ und Fe^{+++} waren ohne Effekt auf die EDTA-Hemmung. Das Enzymmaterial zeigte keine LAP-Aktivität. Nach diesen Befunden sind die im neutralen pH-Bereich H inaktivierenden Enzyme aus

Plasma und Erythrozyten identisch. In Tabelle 14 auf Seite 73 findet sich im Widerspruch zu den bisher zitierten Befunden auch eine Reaktivierung durch Magnesium-Ionen. Die ebenfalls reaktivierenden Zink-Ionen wurden von den anderen Autoren nicht in ihre Untersuchungen mit einbezogen. Die sich widersprechenden Ergebnisse bezüglich der Reaktivierbarkeit der im neutralen pH-Bereich H inaktivierenden Angiotensinase nach EDTA-Hemmung durch Magnesium-Ionen können durch unterschiedlichen Methoden erklärt werden. Im Gegensatz zu unseren Untersuchungen hatten die Autoren das EDTA im Inkubationsgemisch belassen. Im Abschnitt II. der Diskussion auf Seite 46 wurde darauf hingewiesen, daß Reaktivierungsversuche zu falschen Ergebnissen führen können, wenn das EDTA im Inkubationsgemisch belassen wird. Das Magnesium-Ion hat von allen zweiwertigen Metallionen die geringste Affinität zum EDTA (Abb. 10 auf S. 89). Daher ist es wahrscheinlich, daß die Na_2EDTA -Konzentration der Autoren nicht ausgereicht hat, alle Magnesium-Ionen zu binden. Die von ihnen richtig beobachtete Hemmung war dann durch die Bindung von Metallionen mit größerer Affinität zum EDTA bedingt. Die Zugabe von Magnesium-Ionen in dreifachem Überschuß zum EDTA konnte daher zu keiner Reaktivierung führen. Mithin sprechen unsere Befunde nicht dagegen, daß die Plasma- und die Erythrozytenangiotensinase, die das Substrat H im neutralen pH-Bereich inaktivieren, identisch sind. Es kann vermutet werden, daß ähnliche Zuordnungen anderer Plasmaangiotensinasen zu bestimmten Organangiotensinasen möglich sind.

VI. Zur Inaktivierung von Angiotensin II und Angiotensin II-Amid durch unterschiedliche Enzyme

Die Befunde von REGOLI u. Mitarb. (12), NAGATSU u. Mitarb. (16) sowie von OELKERS und v.GOLDACKER (17), die dafür sprechen, daß die Substrate A und H durch unterschiedliche Enzyme inaktiviert werden, sind bereits in der Einleitung auf den Seiten 7 und 8 zitiert worden.

1966 berichteten KHAIRALLAH u. Mitarb. (18), daß eine nach Säulenchromatographie erhaltene Angiotensinase-reiche Plasmafraktion nach Erhitzen auf 60° C für 30 Minuten oder Ausschütteln mit dem gleichen Volumen Chloroform Angiotensin II nicht mehr inaktiviert, während Angiotensin II-Amid weiterhin abgebaut wird. Sie bestätigten damit SAMBHI und BARRET (47), die chromatographisch mit Sephadex G-200 von der Plasmafraktion, die beide Substrate A und H inaktiviert, eine Aminopeptidase abtrennen konnten, die nur H abbaut. Bei weiteren Untersuchungen erreichten KHAIRALLAH und PAGE (19) diese Trennung durch einfache Ammoniumsulfatfraktionierung des Plasmas. Das Enzym, das nur Angiotensin II-Amid inaktiviert, fanden sie in der Fraktion mit mehr als 60 Prozent Ammoniumsulfatsättigung. Sie bezeichneten dieses Enzym als Angiotensinase A₁ und stellten es der spezifisch Angiotensin II abbauenden Angiotensinase A₂ gegenüber, die in der Fraktion zwischen 45 und 60 Prozent Ammoniumsulfatsättigung gefunden wurde. Beide Angiotensinasen konnten bei der Papierelektrophorese den Plasmaalbuminen zugeordnet werden; beide ließen sich durch Na₂EDTA hemmen und durch Calcium-Ionen reaktivieren. Sie unterschieden sich jedoch in ihren pH-Optima. Das pH-Optimum der Angiotensinase A₁ wird von den Autoren mit pH 7,4 und das der Angiotensinase A₂ mit pH 6,8 angegeben.

Die Arbeit von KHAIRALLAH und PAGE (19) bestätigt die in unserer Arbeit gefundenen unterschiedlichen pH-Optima der biologischen Inaktivierung von A und H im neutralen pH-Bereich und bestätigt weiterhin die Annahme, daß es sich hier um unterschiedliche Enzyme handelt. Als die besprochene Veröffentlichung von KHAIRALLAH und PAGE (19) erschien, hatten wir bereits einen Teil der in dieser Arbeit beschriebenen Experimente durchgeführt. Ergänzend können wir noch auf die unterschiedliche Reaktivierbarkeit der beiden im neutralen pH-Bereich wirkenden Angiotensinasen A₁ und

A₂ hinweisen. Bei unseren Versuchen konnte die der Angiotensinase A₂ entsprechende Enzymaktivität nach EDTA-Hemmung nur durch Calcium- und Cobalt-Ionen reaktiviert werden, während die der Angiotensinase A₁ entsprechende Enzymaktivität zusätzlich durch Magnesium- und Mangan-Ionen vollständig und durch Zink-Ionen teilweise reaktivierbar war (Tab. 14 auf S. 73).

Unsere Reaktivierungsversuche (Tab. 14 auf S. 73) bei den von uns ermittelten pH-Optima der biologischen Inaktivierung von A und H im sauren und alkalischen pH-Bereich sprechen dafür, daß die beiden Substrate auch in diesen pH-Bereichen durch unterschiedliche Enzyme inaktiviert werden.

Die EDTA-Hemmung der Inaktivierung von H ließ sich im Alkalischen durch Calcium- und Zink-Ionen aufheben, während die Hemmung der Inaktivierung von A außerdem durch Magnesium-Ionen aufhebbar war. Für die Inaktivierung von A und H durch unterschiedliche Enzyme im Alkalischen spricht auch schon der Befund, daß die Inaktivierung der beiden Substrate verschiedene pH-Optima zeigt, und zwar für A bei pH 8,0 und H bei pH 8,6.

Im sauren pH-Bereich fanden wir allerdings gleiche pH-Optima für die Inaktivierung der beiden Substrate, aber auch hier ergaben sich Unterschiede in der Reaktivierbarkeit nach EDTA-Hemmung. Bei pH 5,6 konnte die Inaktivierung von H nur durch Zink-Ionen reaktiviert werden, während die Inaktivierung von A sowohl durch Zink- als auch durch Calcium-Ionen reaktivierbar war.

VII. Zur Bedeutung der Inkubationszeit

Vor einer weiteren Besprechung soll hier zunächst diskutiert werden, wieso bei früheren Untersuchungen nur ein pH-Optimum der biologischen Inaktivierung der Substrate A und H ermittelt worden ist. Später wurden in einigen Fällen (19,48) auch zwei pH-Optima gefunden, niemals aber drei. Wie läßt sich das erklären? In der Literatur finden sich kaum genaue Angaben über den pH-Bereich auf den die Untersuchungen ausgedehnt worden sind. Ebenso werden Angaben über die gewählten pH-Abstände bei den Untersuchungen vermißt. Daher sind Aussagen über denkbare methodische Unzulänglichkeiten nicht möglich. Eine mögliche Erklärung bieten die unterschiedlich gewählten Inkubationszeiten.

Entsprechend den Ergebnissen anderer Autoren (12,13) zeigte sich bei einem Vorversuch (Abb. 2 auf S. 81), daß die biologische Inaktivierung beider Substrate nur zu Beginn direkt proportional der Zeit erfolgt. Nach einem Aktivitätsverlust von etwa 50 Prozent nähert sich die Inaktivierungsrate asymptotisch der Zeitachse. ITZKOVITZ und MILLER (42) interpretierten dieses auch von ihnen beobachtete Phänomen als Folge der Bildung des im Vergleich zum Octapeptid noch zu 30 bis 40 Prozent vasopressorisch wirksamen Heptapeptids, das nach Abspaltung der N-terminalen Aminosäure resultiert und nur sehr langsam weiter abgebaut würde. KLAUS u. Mitarb. (14) zeigten jedoch, daß das Heptapeptid wesentlich schneller abgebaut wird als das Octapeptid. KHAIRALLAH u. Mitarb. (13) wiesen darauf hin, daß α -Angiotensin leicht in seine β -Form übergehen kann und daraus unterschiedliche Ergebnisse der Autoren resultieren können. RINIKER (6) beobachtete, daß α -L-Aspartyl- und α -L-Asparaginyll-Angiotensin durch Erhitzen leicht in ihre stabilere β -Form isomerisieren. Die β -Angiotensine zeigen nach RINIKER (6) an der Ratte eine doppelt so starke pressorische Wirkung wie die α -Formen und werden in vitro langsamer inaktiviert. Unser α -L-Aspartyl-Angiotensin II hatte nach Angaben der Firma CIBA einen Reinheitsgrad von 90 Prozent. Die übrigen 10 Prozent verteilen sich auf verschiedene Struktur- und Stereoisomere, darunter auch die β -Form, sodaß in den Inkubationsansätzen von vornherein ein kleiner Prozentsatz β -Angiotensin II vorhanden war. Aufgrund der Angaben von RINIKER (6) und KHAIRALLAH u. Mitarb. (13) kann angenommen werden, daß während der Inkubation der Substrate A und H ein kleiner Teil in seine β -Form isomerisiert. Da

die β -Formen eine doppelt so starke vasopressorische Wirkung an der Ratte haben wie die α -Formen und in vitro wesentlich langsamer abgebaut werden, bedingen schon kleine Beimengungen der β -Form eine relativ hohe Restaktivität nach Abbau der α -Form. Mithin ist der oben geschilderte Kurvenverlauf der biologischen Inaktivierung der Substrate am wahrscheinlichsten auf die Anwesenheit und das Auftreten von β -Angiotensin im Inkubationsgemisch zurückzuführen.

Der Kurvenverlauf der biologischen Inaktivierung der Substrate A und H in Abhängigkeit von der Zeit zeigt, daß es wenig sinnvoll ist, Inkubationszeiten zu wählen, in denen mehr als 50 Prozent der eingesetzten Substratmenge inaktiviert werden, da dann eine Nivellierung der pH-Optimumkurve erwartet werden muß. Dies ist eine Erklärung dafür, daß bisher immer weniger als drei pH-Optima der Inaktivierung eines Substrats gefunden worden sind.

VIII. Zu den einzelnen Angiotensinasen

Unsere Ergebnisse sprechen dafür, daß sowohl A als auch H durch mindestens drei unterschiedliche Enzyme inaktiviert werden. Entsprechend ihren optimalen Wirkungsbereichen auf der pH-Skala bietet sich eine Einteilung der Angiotensinasen in "saure", "neutrale" und "alkalische" an.

1. Die "sauren" Angiotensinasen

Bei unseren Untersuchungen fanden wir im sauren pH-Bereich ein für die Substrate A und H gleiches pH-Optimum der biologischen Inaktivierung bei pH 5,6 mit relativ niedrigem Aktivitätsmaximum. Die Reaktivierungsversuche lassen vermuten, daß die beiden Substrate trotz gleicher pH-Optima ihrer Inaktivierung durch unterschiedliche "saure" Angiotensinasen inaktiviert werden. Die A inaktivierende Angiotensinase ließ sich nach EDTA-Hemmung durch Ca^{++} und Zn^{++} reaktivieren, die H inaktivierende nur durch Zn^{++} . Da die mit dem optischen Test ermittelte Asparagin-Abspaltung von H auch im leicht sauren pH-Bereich zwischen pH 6,2 und pH 6,4 ein Maximum zeigte, ist es denkbar, daß die biologische Inaktivierung des Substrats H im Sauren ebenfalls durch eine Aminopeptidase bedingt ist. Daß das mit dem optischen Test ermittelte pH-Optimum um rund 0,7 pH-Einheiten weiter zum Neutralen hin gefunden wurde als das mit dem biologischen Test ermittelte, kann auf die methodischen Unterschiede zurückgeführt werden. Es kann

aber auch nicht ausgeschlossen werden, daß es sich um eine weitere Aminopeptidase handelt, die sich mit dem biologischen Test nicht nachweisen ließ.

Die Existenz eines im sauren pH-Bereich Angiotensin inaktivierenden Enzyms haben auch PICKENS u. Mitarb. (48) zeigen können. Sie fanden im Plasma nach Calcium-Entzug durch Na_2EDTA noch eine Angiotensinaseaktivität mit Maximum bei pH 4,5, die sich durch DFP (Diisopropylfluorophosphat) hemmen ließ. KHAIRALLAH und PAGE (19) konnten durch Ammoniumsulfatfraktionierung des Plasmas ein Enzym abtrennen, das sowohl A als auch H bei einem zwischen pH 5,8 und pH 6,0 liegenden pH-Optimum inaktiviert. Sie nannten das Enzym Angiotensinase B und vermuteten, daß es sich um eine Chymotrypsin-ähnliche Endopeptidase handelt. Diese Angiotensinase B spaltet auch Angiotensin II-Analoga mit veränderten, Aminopeptidase-resistenten N-Terminalen Aminosäuren wie z. B. β -Aspartyl¹-Angiotensin II und Succinyl¹-Angiotensin II. Ähnliche Enzyme wurden bereits von REGOLI u. Mitarb. (12) beschrieben.

Die Angiotensinase B ließ sich durch DFP hemmen und wanderte bei der Papierelektrophorese mit den β -Globulinen des Plasmas. Da sich dieses Enzym durch Dialyse gegen Na_2EDTA hemmen und durch Ca^{++} , Mn^{++} , Mg^{++} und Co^{++} nicht reaktivieren ließ, schlossen die Autoren, daß die Inaktivierung durch EDTA nicht durch Chelatbildung mit einem metallischen Cofaktor, sondern durch Denaturierung des Enzyms bedingt sei. Ihre Befunde stimmen jedoch mit den unseren überein, wenn die Autoren die Reaktivierungsversuche nur mit dem Substrat H durchgeführt haben. Genaue Angaben darüber fehlen in ihrer Arbeit. Calcium-Ionen heben nach unseren Untersuchungen nur die EDTA-Hemmung der Inaktivierung von A auf. Das von den Autoren nicht getestete Zn^{++} hebt die EDTA-Hemmung der Inaktivierung beider Substrate schon bei sehr kleinen Konzentrationen auf. Im Gegensatz zu den Angaben von KHAIRALLAH und PAGE (19) beobachteten wir auch eine Hemmung der "sauren" Angiotensinasen durch Dialyse gegen 0,9%ige NaCl-Lösung. Dies spricht gegen eine feste Bindung der Metallionen an die Enzymproteine. Demnach ist die durch das EDTA bedingte Hemmung der "sauren" Angiotensinasen nicht durch Denaturierung zu erklären, sondern auch durch Chelatbildung mit einem metallischen Cofaktor.

2. Die "neutralen" Angiotensinasen

Die Befunde von KHAIRALLAH und PAGE (19), die bestätigen, daß die Substrate A und H im neutralen pH-Bereich durch unterschiedliche Enzyme inaktiviert werden, wurden bereits auf den Seiten 55 und 56 im Abschnitt VI. der Diskussion angeführt. Ihre Befunde stimmen weitgehend mit unseren überein. Die Autoren ermittelten das pH-Optimum der nur H inaktivierenden Angiotensinase A_1 bei pH 7,4 und das der nur A inaktivierenden Angiotensinase A_2 bei pH 6,8. Wir fanden das pH-Optimum des H inaktivierenden Enzyms nur 0,2 pH-Einheiten weiter zum Säuren hin bei pH 7,2 und das des nur A spaltenden Enzyms übereinstimmend bei pH 6,8. Unterschiede finden sich jedoch bei den Angaben über die Reaktivierbarkeit der beiden Angiotensinasen nach EDTA-Hemmung. Die EDTA-Hemmung der Spaltung von A war bei unseren Untersuchungen nur durch Ca^{++} und Co^{++} aufhebbar, während die EDTA-Hemmung der Spaltung von H durch Ca^{++} , Mg^{++} , Mn^{++} und Co^{++} vollständig sowie durch Zn^{++} teilweise aufgehoben werden konnte. KHAIRALLAH und PAGE (19) fanden eine totale Reaktivierung des durch EDTA gehemmten Komplexes Angiotensinase A nur mit Ca^{++} und eine partielle Reaktivierung mit Mn^{++} und Co^{++} in jeweils 10^{-3} m Konzentration. Mg^{++} in gleicher Konzentration war unwirksam. Die Autoren geben allerdings nicht an, mit welchem Substrat (A oder H) die Reaktivierungsversuche durchgeführt wurden. Manche Unterschiede zwischen unseren Ergebnissen und denen von KHAIRALLAH und PAGE (19) könnten aber auch durch unterschiedliche Konzentrationen der Metallionen erklärt werden. In Tabelle 15 auf Seite 74 findet sich, daß bereits 5×10^{-4} m Mn^{++} und Co^{++} die neutralen Angiotensinasen hemmen, während kleinere Konzentrationen total reaktivieren. Wird nur eine Konzentration eines Metallions geprüft, dann kann diese partielle Hemmung auch als partielle Reaktivierung interpretiert werden.

Nach den Erläuterungen im Abschnitt III. der Diskussion ist es sehr wahrscheinlich, daß im neutralen pH-Bereich fast ausschließlich Aminopeptidasen für die biologische Inaktivierung verantwortlich sind. Die Übereinstimmung des pH-Optimums der biologischen Inaktivierung von H mit dem pH-Optimum der Asparaginabspaltung von H im neutralen pH-Bereich bestätigt diese Annahme für das Substrat H.

3. Die "alkalischen" Angiotensinasen

Eine Angiotensinaseaktivität im alkalischen pH-Bereich wurde bisher nur von OELKERS und v.GOLDACKER (17) beobachtet. Bei der Bestimmung der pH-Optimumkurve der Asparaginabspaltung von H mit dem optischen Test fanden sie ein flaches Aktivitätsmaximum zwischen pH 8,0 und pH 9,0 in 0,05 m Tris-HCl-Puffer. Ob es sich dabei um ein zweites Enzym handelt, oder ob die pH-Optima des gleichen Enzyms in Phosphatpuffer und Tris-Puffer verschieden sind, konnten die Autoren noch nicht entscheiden.

Unsere Ergebnisse sprechen dafür, daß beide Substrate (A und H) im alkalischen pH-Bereich durch ein drittes Enzym inaktiviert werden. Die im alkalischen pH-Bereich gefundenen Aktivitätsmaxima sind deutlich von den im neutralen pH-Bereich gefundenen getrennt. (Abb. 6). Nach EDTA-Hemmung zeigt sich eine unterschiedliche Reaktivierbarkeit durch zweiwertige Metallionen im Vergleich zu den im Neutralen und Sauren wirkenden Angiotensinasen. Unsere Ergebnisse sprechen weiterhin dafür, daß auch im Alkalischen beide Substrate durch unterschiedliche Enzyme inaktiviert werden. Die Inaktivierung von A und H zeigt unterschiedliche pH-Optima (Abb. 6) und nach EDTA-Hemmung auch eine unterschiedliche Reaktivierbarkeit (Tab. 14). Das A spaltende Enzym (pH-Optimum zwischen pH 7,6 und pH 8,0) wird durch Ca^{++} , Mg^{++} , Zn^{++} und Co^{++} total reaktiviert, während das H spaltende Enzym (pH-Optimum bei pH 8,6 und darüber) nur durch Zn^{++} und Ca^{++} reaktiviert wird.

Der gleichartige Kurvenverlauf der biologischen Inaktivierung von H und der mit dem optischen Test ermittelten Asparaginabspaltung von H in Abhängigkeit vom pH-Wert (Abb. 9) im Alkalischen läßt den Schluß zu, daß H hier durch eine Aminopeptidase inaktiviert wird. Es kann allerdings auch nicht ausgeschlossen werden, daß es sich um mehrere Aminopeptidasen handelt.

Die bereits im Teil III. der Diskussion auf Seite 49 und 50 mitgeteilten Befunde anderer Autoren (12,14,16) lassen vermuten, daß auch das Substrat A im wesentlichen durch Aminopeptidasen inaktiviert wird. Diese Befunde wurden zwar nur im physiologischen pH-Bereich des Plasmas erhoben, da aber das zwischen pH 7,6 und pH 8,0 gefundene pH-Optimum der biologischen Inaktivierung von A nur 0,2 bis 0,6 pH-Einheiten vom physiologischen pH-Bereich des Plasmas entfernt liegt, dürften die Befunde dieser Autoren auch hier

noch Gültigkeit haben.

IX. Praktische Konsequenzen

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen bestätigen und ergänzen die Befunde zu der bemerkenswerten Heterogenität der Angiotensinasen. Daraus ergeben sich eine Reihe von Konsequenzen?

1. Es ist nicht belanglos, welches Substrat für Untersuchungen über Angiotensinasen verwendet wird, da die Substrate A und H im neutralen pH-Bereich sicher und wahrscheinlich auch im von uns untersuchten sauren und alkalischen pH-Bereich durch unterschiedliche Enzyme inaktiviert werden. Die mit dem Substrat H erhobenen Befunde dürfen nicht auf das Substrat A übertragen werden. Weitere Untersuchungen sollten zumindest mit dem Substrat A (α -L-Asp¹-Val⁵-Angiotensin II), oder noch besser nur mit dem menschlichen Substrat, dem α -L-Asp¹-Ileu⁵-Angiotensin II durchgeführt werden.
2. Dem pH-Wert, bei dem die Untersuchungen mit Angiotensinasen durchgeführt werden, kommt eine entscheidende Bedeutung für den Ausfall der Ergebnisse zu. Unsere Befunde sprechen dafür, daß sowohl A als auch H durch mindestens drei unterschiedliche Enzyme inaktiviert wird. Die Enzyme sind durch unterschiedliche pH-Optima und unterschiedliche Reaktivierbarkeit durch zweiwertige Metallionen nach EDTA-Hemmung gekennzeichnet.
3. Untersuchungen über Angiotensinaseaktivitäten in Gewebs- oder Organhomogenaten müssen auf einen größeren pH-Bereich ausgedehnt werden, damit alle Enzymaktivitäten erfaßt werden. Da die Plasmaangiotensinasen in das Plasma emigrierte Gewebsangiotensinasen sind, müssen auch bei den Gewebsangiotensinasen im sauren und alkalischen pH-Bereich wirkende Angiotensinasen erwartet werden. Die oben genannten Punkte 1. und 2. gelten analog für die Gewebsangiotensinasen.
4. Die bei Renin- und Renin-Substrat-Bestimmungen störende Angiotensinaseaktivität (26,27) kann im gesamten von uns untersuchten pH-Bereich (von pH 5,2 bis pH 8,6) allein durch Na₂EDTA vollständig gehemmt werden. Zur sicheren Hemmung der "neutralen" Angiotensinasen und der H spaltenden "alkalischen" Angiotensinase sind jedoch Konzentrationen des Na₂EDTA von mehr als 10⁻³ m erforderlich. Im sauren pH-Bereich, in dem die Renin- und Renin-Substrat-Bestimmungen durchgeführt werden, reicht

diese Na_2EDTA -Konzentration jedoch schon aus.

Weitere Konsequenzen ergeben sich aus den praktischen Erfahrungen, die wir bei unseren Versuchen gemacht haben.

5. Jeder Untersucher sollte die pH-Optimumkurve des Abbaus von A mit seiner Methode selbst ermitteln, da bereits kleine Änderungen der Inkubationsbedingungen, wie z. B. die Verwendung eines anderen Puffers zum Einstellen der pH-Werte, zur Verschiebung eines pH-Optimums führen können, wie wir es auf Seite 48 gezeigt haben.
6. Bei der Bestimmung der pH-Optimumkurven der biologischen Inaktivierung sollten die Inkubationszeiten so gewählt werden, daß der Aktivitätsverlust der eingesetzten Angiotensinmenge 50 Prozent nicht überschreitet, da es sonst aus den auf den Seiten 57 und 58 angegebenen Gründen zu einer Nivellierung der pH-Optimumkurven kommen kann, so daß die einzelnen pH-Optima nicht mehr scharf voneinander getrennt und damit nicht mehr feststellbar sind.
7. Die Testung der Reaktivierbarkeit durch EDTA gehemmter Angiotensinasen sollte nur mit Plasma bzw. einem Gewebshomogenat erfolgen, das gegen Na_2EDTA dialysiert worden ist und aus dem anschließend das EDTA mit den komplexartig gebundenen Metallionen durch weitere Dialyse gegen physiologische Kochsalzlösung oder bidestilliertes Wasser entfernt worden ist. Befindet sich das EDTA mit den komplexartig gebundenen Metallionen bei Reaktivierungsversuchen noch im Inkubationsgemisch, dann sind die Ergebnisse, wie auf den Seiten 46 und 47 gezeigt wurde, wegen der unterschiedlichen Stabilitätskonstanten der verschiedenen EDTA-Metall-Chelate schwer interpretierbar.

F. ZUSAMMENFASSUNG

Die sich oft widersprechenden Angaben in der Literatur über Eigenschaften der Plasmaangiotensinasen waren in Hinblick auf die sich immer mehr bestätigende Vermutung, daß Angiotensin II (A) im neutralen pH-Bereich durch andere Plasmapeptidasen inaktiviert wird als Angiotensin II-Amid (H), der Anlaß, die Inaktivierung der beiden Substrate in Abhängigkeit von der Konzentration verschiedener zweiwertiger Metallionen über einen größeren pH-Bereich unter gleichen Standardbedingungen vergleichend zu untersuchen. Die Inaktivierung der Substrate wurde mit einem biologischen Test an der Ratte ermittelt. Der Entzug freier Metallionen erfolgte einmal durch direkt dem Inkubationsgemisch zugesetztes Na_2EDTA und zum anderen durch Dialyse gegen 10^{-3} bzw. 10^{-2} m Na_2EDTA -Lösung. Reaktivierungsversuche wurden mit Ca^{++} , Mg^{++} , Zn^{++} , Mn^{++} und Co^{++} durchgeführt. Ergänzend wurde die biologische Inaktivierung von Angiotensin II-Amid mit der Asparaginabspaltung aus dem gleichen Substrat, die mit einem von OELKERS und v.GOLD-ACKER (17) angegebenen DPN-H-abhängigen optischen Test ermittelt wurde, in Abhängigkeit vom pH-Wert vergleichend untersucht.

Der Vergleich der pH-Abhängigkeit der biologischen Inaktivierung von A und H durch menschliches Plasma (Abb. 6 auf Seite 85) ergab:

1. Für eine vergleichbare Inaktivierung muß A im gesamten untersuchten pH-Bereich etwa zwölfmal länger inkubiert werden als H.
2. Die pH-Optima der Inaktivierung von A liegen bei pH 5,6, pH 6,8 und pH 7,6-8,0. Bei pH 6,8 ist die Inaktivierung absolut am größten.
3. Die pH-Optima der Inaktivierung von H liegen bei pH 5,6 und pH 7,2. Jenseits pH 8,0 erfolgt eine weitere Zunahme der Inaktivierung, deren Maximum in Trismaleatpuffer nicht ermittelt werden konnte.
4. Die pH-Optima der Inaktivierung von A und H stimmen also im Sauren überein, während sich im Neutralbereich und im Alkalischen Unterschiede finden.

Diese Befunde lassen den Schluß zu, daß jedes Substrat durch mindestens drei unterschiedliche Enzyme inaktiviert wird. Die unterschiedlichen pH-Optima der Inaktivierung beider Substrate im Neutralbereich und im Alkalischen lassen vermuten, daß sich die A bzw. H inaktivierenden Enzyme unterscheiden.

Dieser Befund wird durch die Ergebnisse der Reaktivierungsversuche mit gegen Na_2EDTA dialysiertem Plasma bestätigt. Dabei wurden konzentrationsabhängig folgende zweiwertige Metallionen als Reaktivatoren ermittelt:

für die Inaktivierung von A bei pH 5,6: Ca^{++} und Zn^{++} ,
für die Inaktivierung von H bei pH 5,6: Zn^{++} ,
für die Inaktivierung von A bei pH 6,8: Ca^{++} und Co^{++} ,
für die Inaktivierung von H bei pH 7,2: Ca^{++} , Mg^{++} , Mn^{++} , Co^{++}
und nur partiell reaktivierend auch Zn^{++} ,
für die Inaktivierung von A bei pH 8,0: Ca^{++} , Mg^{++} , Zn^{++} und Co^{++} ,
für die Inaktivierung von H bei pH 8,6: Ca^{++} und Zn^{++} .

Diese Befunde lassen zusammen mit den zuvor genannten den Schluß zu, daß: 1. Jedes Substrat durch mindestens drei unterschiedliche Enzyme inaktiviert wird, und
2. das Substrat A bei allen ermittelten pH-Optima durch andere Enzyme inaktiviert als H bei den pH-Optima seiner Inaktivierung.

Im sauren pH-Bereich unterscheiden sich die A und H inaktivierenden Enzyme nur in ihrer Reaktivierbarkeit, während sie sich im Neutralbereich und im Alkalischen außer in ihrer Reaktivierbarkeit auch in ihren pH-Optima unterscheiden.

Der Vergleich der pH-Abhängigkeit der biologischen Inaktivierung von H mit der im optischen Test ermittelten Spaltung von H durch Aminopeptidasen ergab:

1. Im Neutralbereich stimmt das pH-Optimum der Aminopeptidaseaktivität mit dem pH-Optimum der biologischen Inaktivierung überein.
2. Im Alkalischen findet sich übereinstimmend mit der biologischen Inaktivierung von H ein erneuter Aktivitätsanstieg der Spaltung von H durch Aminopeptidasen, dessen Maximum mit Trisma-leatpuffer nicht ermittelt werden konnte.
3. Die Aminopeptidaseaktivität zeigt auch im sauren pH-Bereich ein weiteres Maximum, das bei pH 6,2-6,4 liegt und nicht mit dem bei pH 5,6 gefundenen Maximum der biologischen Inaktivierung übereinstimmt.

Die Punkte 1. und 2. sprechen dafür, daß die biologische Inaktivierung von H im Neutralbereich und im Alkalischen im wesentli-

chen durch Amino-peptidasen erfolgt. Ob das im optischen Test bei pH 6,2-6,4 gefundene Aktivitätsmaximum durch eine weitere Amino-peptidase bedingt ist, oder ob die pH-Optima des gleichen Enzyms bei beiden Methoden verschieden sind, läßt sich nicht entscheiden.

Die Ergebnisse unserer Arbeit wurden mit denen anderer Untersucher verglichen. Dabei zeigte sich eine gute Übereinstimmung mit den Befunden von KHAIRALLAH und PAGE (19), die die im Neutralbereich A und H inaktivierenden Enzyme durch Ammoniumsulfatfraktionierung des Plasmas trennen konnten.

Die durch unsere Untersuchungen bestätigte bemerkenswerte Heterogenität der Angiotensinasen sollte bei zukünftigen Untersuchungen mehr berücksichtigt werden. Da die mit dem Substrat Angiotensin II-Amid erhobenen Befunde über Angiotensinasen nicht auf die Angiotensin II spaltenden Angiotensinasen übertragen werden können, sollten weitere Untersuchungen über Angiotensinasen nur mit dem Substrat Angiotensin II durchgeführt werden.

Tab. 1: Leerwerte zur Bestimmung der pH-Optimumkurve der biologischen Inaktivierung von A (links) und H (rechts). Inkubation mit 0,9%iger NaCl-Lösung statt mit Plasma.

pH	T ₀ ng A	T ₁₂₀ ng A	Abbau in %	T ₀ ng H	T ₁₀ ng H	Abbau in %
5,2	20,0	20,0	0	20,0	20,0	0
5,4	21,6	21,6	0	-	-	-
5,6	20,6	20,6	0	20,0	20,0	0
5,8	20,0	20,0	0	-	-	-
6,0	20,0	20,0	0	20,0	20,0	0
6,4	21,8	21,8	0	17,5	17,5	0
6,8	20,0	20,0	0	19,0	19,0	0
7,0	20,5	19,5	7	-	-	-
7,2	20,8	19,2	8	18,6	18,6	0
7,4	18,3	17,0	7	-	-	-
7,6	21,6	20,0	7	20,0	20,0	-
7,8	20,0	18,4	8	-	-	-
8,0	22,0	20,2	8	18,9	17,8	6
8,5	-	-	-	20,0	20,0	0
8,6	20,0	18,4	8	-	-	-

Tab. 2: Werte zur Bestimmung der pH-Optimumkurve der biologischen Inaktivierung von A

pH	Test an 1. Ratte			Test an 2. Ratte			Mittelwert
	T ₀ ng A	T ₁₂₀ ng A	Abbau in %	T ₀ ng A	T ₁₂₀ ng A	Abbau in %	Abbau in %
5,2	20,0	20,0	0	18,1	18,0	0	0,0
5,4	20,8	17,4	14	21,8	17,8	18	16,0
5,6	22,8	17,8	22	21,8	16,9	22	22,0
5,8	21,0	20,0	5	21,8	19,3	11	8,0
6,0	20,0	19,1	5	20,0	20,0	0	2,5
6,4	21,8	17,2	22	21,8	17,4	20	21,0
6,8	21,6	10,3	52	21,8	10,9	50	51,0
7,0	19,0	10,9	43	18,4	10,0	46	44,5
7,2	21,3	11,0	43	20,0	11,0	45	44,0
7,4	20,0	14,9	25	20,0	14,6	27	26,0
7,6	20,0	10,6	47	20,0	11,0	45	46,0
7,8	21,9	12,0	45	21,6	11,6	47	46,0
8,0	20,8	10,3	51	20,0	10,5	49	50,0
8,6	20,0	12,9	36	20,0	11,7	42	39,0

T₀ = Nullwert, T₁₀ = Wert nach 10 Min. Inkubation, T₁₂₀ = Wert nach 120 Min. Inkubation

Tab. 3: Werte zur Bestimmung der pH-Optimumkurve der biologischen Inaktivierung von H

pH	Test an 1. Ratte			Test an 2. Ratte			Mittelwert
	T ₀ ng H	T ₁₀ ng H	Abbau in %	T ₀ ng H	T ₁₀ ng H	Abbau in %	Abbau in %
5,2	18,0	17,7	2	18,6	18,0	3	2,5
5,6	20,0	16,0	20	20,0	14,0	30	25,0
6,0	17,0	17,0	0	19,5	18,5	5	2,5
6,4	16,2	14,2	12	15,8	14,4	9	10,5
6,8	16,7	11,9	29	16,5	10,0	39	34,0
7,2	23,3	10,0	57	24,5	10,0	59	58,0
7,6	16,0	11,3	29	15,0	10,0	32	30,5
8,0	18,3	14,4	21	17,0	11,0	35	28,0
8,5	18,5	10,9	42	20,0	12,0	40	41,0

Tab. 4: Zusammenfassung der Werte zur Bestimmung der biologischen Inaktivierung links von A mit den Mittelwerten aus Tab. 2 (1. Inkubation) und Tab. 6 (2. Inkubation) und rechts von H mit den Mittelwerten aus Tab. 3 (1. Inkubation) und Tab. 7 (2. Inkubation) in Prozent Abbau für Abbildung 6 auf Seite 85.

pH	Angiotensin II (A)			Angiotensin II-Amid (H)		
	1.Ink.	2.Ink.	Mittelw.	1.Ink.	2.Ink.	Mittelwert
5,2	0	3	1,5	2,5	2,5	2,5
5,4	16	17	16,5	-	8,0	8,0
5,6	22	22	22,0	25,0	21,5	23,3
5,8	8	12	10,0	-	14,5	14,5
6,0	3	18	10,5	2,5	16,5	9,5
6,4	21	37	29,0	10,5	8,0	9,3
6,8	51	58	54,5	34,0	49,0	41,5
7,0	38	38	38,0	-	-	-
7,2	36	37	36,5	58,0	52,5	55,3
7,4	20	15	17,5	-	-	-
7,6	39	35	37,0	30,5	12,5	21,5
7,8	38	38	38,0	-	-	-
8,0	42	36	39,0	28,0	18,0	23,0
8,5	-	-	-	41,0	42,5	41,7
8,6	29	28	28,5	-	-	-

Die Werte für A wurden um die jeweilige Spontanhydrolyse, die für die 1. Inkubation aus Tab. 1 und für die 2. Inkubation aus Tab. 5 ersichtlich ist, korrigiert.

Tab. 5: Leerwerte zur Bestimmung der pH-Optimumkurve der biologischen Inaktivierung von A (links) und H (rechts). Inkubation mit 0,9%iger NaCl-Lösung statt mit Plasma.

pH	T ₀	T ₁₂₀	Abbau	T ₀	T ₁₀	Abbau
	ng A	ng A	in %	ng H	ng H	in %
5,2	20,0	20,0	0	21,0	21,0	0
5,4	20,9	20,9	0	16,9	16,7	1
5,6	21,8	21,8	0	19,2	19,2	0
5,8	-	-	-	19,0	19,0	0
6,0	19,5	19,8	0	21,0	20,0	5
6,4	20,0	20,0	0	21,2	20,6	3
6,8	20,0	18,8	6	18,7	18,8	0
7,0	19,1	17,9	7	-	-	-
7,2	20,0	18,5	8	20,0	20,0	0
7,4	18,5	17,0	7	-	-	-
7,6	18,0	16,0	11	20,0	20,0	0
7,8	21,0	19,1	9	-	-	-
8,0	21,6	19,8	8	18,6	18,7	0
8,5	-	-	-	19,4	19,4	0
8,6	19,0	17,4	9	-	-	-

Tab. 6: Werte zur Bestimmung der pH-Optimumkurve der biologischen Inaktivierung von A

pH	Test an 1. Ratte			Test an 2. Ratt			Mittelwert
	T ₀	T ₁₂₀	Abbau	T ₀	T ₁₂₀	Abbau	Abbau
	ng A	ng A	in %	ng A	ng A	in %	in %
5,2	20,0	19,0	5	20,0	20,0	0	2,5
5,4	21,4	17,3	19	20,6	17,5	15	17,0
5,6	22,9	17,0	26	22,3	18,5	17	21,5
5,8	20,0	19,0	5	19,0	15,3	19	12,0
6,0	20,0	14,5	26	20,0	18,0	10	18,0
6,4	18,7	11,8	37	20,0	12,8	36	36,5
6,8	20,0	7,0	65	21,4	6,9	68	66,5
7,0	19,2	11,2	42	19,0	10,0	47	44,5
7,2	20,0	11,1	45	18,3	10,0	45	45,0
7,4	20,0	16,4	18	20,0	15,0	25	21,5
7,6	16,5	7,8	53	19,5	11,6	40	46,5
7,8	19,4	10,0	48	21,8	11,9	46	47,0
8,0	21,4	11,7	45	20,0	11,8	41	43,0
8,6	20,8	13,9	33	20,0	11,8	41	37,0

Tab. 7: Werte zur Bestimmung der pH-Optimumkurve der biologischen Inaktivierung von H.

pH	Test an 1. Ratte			Test an 2. Ratte			Mittelwert
	T ₀ ng H	T ₁₀ ng H	Abbau in %	T ₀ ng H	T ₁₀ ng H	Abbau in %	Abbau in %
5,2	21,0	21,0	0	19,4	18,4	5	2,5
5,4	18,6	17,2	8	-	-	-	8,0
5,6	24,8	20,0	19	20,0	15,2	24	21,5
5,8	20,0	17,0	15	20,0	17,2	14	14,5
6,0	20,6	16,9	18	20,0	17,1	15	16,5
6,4	17,5	15,5	11	17,0	16,2	5	8,0
6,8	20,0	10,0	50	18,1	9,4	48	49,0
7,2	20,0	8,8	56	14,0	7,2	49	52,5
7,6	20,0	16,3	19	17,8	16,7	6	12,5
8,0	20,0	17,6	12	16,7	12,7	24	18,0
8,5	20,0	11,2	44	20m0	11,8	41	42,5

Tab. 8: Werte zur Bestimmung der pH-Optimumkurve der biologischen Inaktivierung von A unter Zusatz von Na₂EDTA (10⁻³ m)

pH	Test an 1. Ratte			Test an 2. Ratte			Mittelwert
	T ₀ ng A	T ₁₂₀ ng A	Abbau in %	T ₀ ng A	T ₁₂₀ ng A	Abbau in %	Abbau in %
5,2	20,0	20,0	0	20,0	20,0	0	0,0
5,4	20,0	20,0	0	20,0	18,6	7	3,5
5,6	23,1	22,4	3	19,0	19,2	0	1,5
5,8	20,8	20,0	4	20,0	19,2	4	4,0
6,0	20,0	19,1	5	22,2	22,0	2	3,5
6,4	20,0	17,3	14	21,6	20,0	7	10,5
6,8	21,2	10,7	50	20,0	10,0	50	50,0
7,0	19,0	12,3	35	18,4	12,0	35	35,0
7,2	20,0	17,4	14	-	-	-	14,0
7,4	20,0	20,0	0	19,3	17,8	9	4,5
7,6	17,1	17,5	0	19,0	16,0	16	8,0
7,8	20,8	18,5	11	20,0	20,0	0	5,5
8,0	22,3	22,6	1	13,6	13,3	4	2,5
8,6	20,0	20,0	0	17,1	17,1	0	0,0

Tab. 9: Werte zur Bestimmung der pH-Optimumkurve der biologischen Inaktivierung von A unter Zusatz von CaCl_2 (10^{-3} m)

pH	Test an 1. Ratte			Test an 2. Ratte			Mittelwert
	T_0 ng A	T_{120} ng A	Abbau in %	T_0 ng A	T_{120} ng A	Abbau in %	Abbau in %
5,2	20,0	20,0	0	20,0	20,0	0	0,0
5,4	20,7	18,6	10	20,0	18,5	8	9,0
5,6	24,0	18,5	23	21,6	16,3	25	24,0
5,8	20,0	19,1	4	20,0	20,0	0	2,0
6,0	20,0	20,0	0	20,0	20,0	0	0,0
6,4	20,0	17,2	14	20,6	14,3	31	22,5
6,8	21,6	10,0	54	21,4	10,9	49	51,5
7,0	20,0	10,9	46	20,0	10,8	46	46,0
7,2	20,0	12,9	36	20,0	10,6	47	41,5
7,4	20,0	15,8	21	19,0	15,0	21	21,0
7,6	20,0	12,8	36	20,0	11,8	41	38,5
7,8	21,6	11,0	49	20,0	11,0	45	47,0
8,0	20,0	10,9	46	18,2	10,0	45	45,5
8,6	21,0	13,9	36	20,0	12,7	37	36,5

Tab. 10: Werte zur Bestimmung der pH-Optimumkurve der biologischen Inaktivierung von A unter Zusatz von Na_2EDTA (10^{-3} m) und CaCl_2 (3×10^{-3} m)

pH	Test an 1. Ratte			Test an 2. Ratte			Mittelwert
	T_0 ng A	T_{120} ng A	Abbau in %	T_0 ng A	T_{120} ng A	Abbau in %	Abbau in %
5,2	20,0	19,0	5	18,4	17,0	7	6,0
5,4	20,6	20,0	3	20,0	18,5	7	5,0
5,6	21,4	21,4	0	20,0	20,0	0	0,0
5,8	21,0	20,1	4	20,0	20,0	0	2,0
6,0	20,0	20,0	0	20,0	20,0	0	0,0
6,4	22,0	19,4	13	20,0	17,1	15	14,0
6,8	22,7	12,0	47	23,9	11,0	54	50,5
7,0	21,7	12,9	41	18,3	11,3	38	39,5
7,2	20,0	11,3	43	20,0	13,5	32	37,5
7,4	20,0	16,8	16	20,0	15,0	25	20,5
7,6	20,0	12,2	39	20,0	12,0	40	39,5
7,8	21,5	12,5	43	22,0	12,9	41	42,0
8,0	21,9	11,9	45	20,0	11,3	44	44,5
8,6	20,0	13,3	34	18,3	13,3	28	31,0

Tab. 11: Werte zur Bestimmung der pH-Optimumkurve der biologischen Inaktivierung von H unter Zusatz von Na_2EDTA (10^{-3} m).

pH	Test an 1. Ratte			Test an 2. Ratte			Mittelwert
	T_0 ng H	T_{10} ng H	Abbau in %	T_0 ng H	T_{10} ng H	Abbau in %	Abbau in %
5,2	19,8	19,0	4	18,6	18,0	3	3,5
5,4	19,3	19,3	0	-	-	-	0,0
5,6	15,7	15,7	0	17,5	18,0	0	0,0
5,8	22,5	22,6	0	20,0	20,0	0	0,0
6,0	20,0	20,0	0	20,0	20,0	0	0,0
6,4	21,3	19,3	9	19,1	18,5	8	8,5
6,8	17,6	16,0	9	19,1	18,5	8	8,5
7,2	20,0	10,9	45	16,4	10,0	39	42,0
7,6	18,2	14,4	20	18,8	16,3	13	16,5
8,0	20,0	17,3	14	17,3	15,0	13	13,5
8,5	20,7	11,0	47	17,4	10,0	43	45,0

Tab. 12: wie Tab. 11, aber mit CaCl_2 (10^{-3} m) statt Na_2EDTA

5,2	16,9	15,6	8	18,3	18,1	1	4,5
5,4	17,9	17,9	0	-	-	-	0,0
5,6	20,0	16,3	19	19,3	15,4	20	19,5
5,8	16,7	14,4	14	17,4	16,1	8	11,0
6,0	20,6	18,8	9	19,0	17,6	7	8,0
6,4	17,8	15,6	12	17,5	14,5	17	14,5
6,8	20,0	10,0	50	16,3	8,3	49	49,5
7,2	20,0	9,5	53	16,3	8,5	48	50,5
7,6	20,0	14,8	26	18,2	16,0	12	19,0
8,0	19,4	17,6	9	18,8	16,5	12	10,5
8,5	19,3	18,6	4	20,0	16,0	20	12,0

Tab. 13: wie Tab. 11, aber mit Na_2EDTA (10^{-3} m) und CaCl_2 (3×10^{-3} m)

5,2	20,0	18,6	7	20,0	20,0	0	3,5
5,4	20,4	20,4	0	-	-	-	0,0
5,6	18,8	18,4	2	17,9	17,5	2	2,0
5,8	19,5	18,4	6	18,0	16,9	6	6,0
6,0	21,2	19,8	7	17,3	16,0	8	7,5
6,4	23,2	22,2	4	17,8	16,4	8	6,0
6,8	16,9	16,5	2	13,7	13,0	5	3,5
7,2	18,5	11,4	38	18,8	9,2	51	44,5
7,6	18,2	15,5	15	16,9	14,5	14	14,5
8,0	20,0	16,7	17	19,1	17,0	11	14,0
8,5	18,6	16,4	12	19,3	16,3	16	14,0

SUBSTRAT		A			H		
pH		5,6	6,8	8,0	5,6	7,2	8,6
Inkubationszeit in Minuten		720	180	180	60	15	15
PLASMA 1:10 verdünnt		47	48	50	39	53	45
nach Dialyse gegen NaCl 0,9 %ig		0	21	25	0	25	23
nach Dialyse gegen Na ₂ EDTA 0,01 m		0	0	0	0	15	12
IONEN ZUM Na ₂ EDTA-DIALYSIERTEN PLASMA (1:10 verd.)	Ca ⁺⁺ 25 · 10 ⁻⁴ m	22 +	44 ++	50 ++	0	58 ++	50 ++
	25 · 10 ⁻³ m	47 ++	45 ++	50 ++	0	56 ++	50 ++
	Mg ⁺⁺ 10 ⁻⁴ m	1 o	0 o	44 ++	0 o	53 ++	0 o
	10 ⁻³ m	0 o	5 o	45 ++	0 o	50 ++	5 o
	Zn ⁺⁺ 5 · 10 ⁻⁶ m	35 +	5 o	36 +	/	40 +	24 (+)
	5 · 10 ⁻⁵ m	45 ++	6 o	45 ++	33 ++	41 +	45 ++
	5 · 10 ⁻⁴ m	38 +	5 o	33 +	38 ++	25 +	0 o
	Mn ⁺⁺ 10 ⁻⁵ m	0 o	7 o	9 o	0 o	41 +	0 o
	10 ⁻⁴ m	5 o	7 o	15 (o)	0 o	50 ++	0 o
	Co ⁺⁺ 10 ⁻⁶ m	7 o	30 +	33 +	0 o	46 ++	0 o
	10 ⁻⁴ m	11 (o)	47 ++	50 ++	4 o	46 ++	5 o

Tabelle 14: Biologische Inaktivierung von Angiotensin II (A) und Angiotensin II-Amid (H) bei den ermittelten pH-Optima nach Dialyse gegen 0,9%ige NaCl-Lösung bzw. gegen 10⁻² m Na₂EDTA-Lösung. Reaktivierbarkeit der Angiotensin-abbauenden Enzyme nach Dialyse gegen Na₂EDTA durch divalente Kationen in verschiedenen Konzentrationen (angegeben als Endkonzentration im 1:10 verdünnten Plasma). Zahlen: Prozent Verlust an pressorischer Wirkung. - partielle Hemmung. -- totale Hemmung. + partielle Reaktivierung. ++ totale Reaktivierung. o keine Reaktivierung.

SUBSTRAT		A			H		
pH		5,6	6,8	8,0	5,6	7,2	8,6
Inkubationszeit in Min.		360	180	180	30	15	15
PLASMA		46	50	50	48	50	47
SERUM		41	46	52	38	53	50
Plasma nach Dialyse gegen NaCl 0,9%ig		0	30	42	0	43 (-)	30
Plasma nach Dialyse gegen Na ₂ EDTA ^{0,001 m}		0	26	13	0	40 (-)	22
IONEN ZUM 1:10 VERDÜNNTEN Na ₂ EDTA-DIALYSIERTEN PLASMA	Ca ⁺⁺	2,5 · 10 ⁻⁴ m	23 +	54 ++	0	57 ++	45 ++
		2,5 · 10 ⁻³ m	46 ++	62 ++	0	50 ++	45 ++
		5 · 10 ⁻³ m	48 ++	50 ++	0	50 ++	42 ++
	Mg ⁺⁺	10 ⁻⁴ m	3 o	25 o	3	40 o	21 o
		5 · 10 ⁻⁴ m	4 o	31 o	4	38 o	25 o
		5 · 10 ⁻³ m	5 o	31 o	4	48 (+)	30 o
	Zn ⁺⁺	5 · 10 ⁻⁶ m	30 +	25 o	40 +	51 (++)	24 o
		5 · 10 ⁻⁵ m	40 ++	30 o	33 +	47 (+)	50 ++
		5 · 10 ⁻⁴ m	46 ++	26 o	20 +	47 (+)	17 o
		5 · 10 ⁻² m	44 ++	0 o	20 +	0 o	0 o
	Mn ⁺⁺	10 ⁻⁷ m	10 (o)	25 o	8 o	50 (+)	20 o
		10 ⁻⁵ m	9 (o)	38 (o)	6 o	50 (+)	/
		10 ⁻⁴ m	9 (o)	40 (+)	13 (o)	59 ++	0 o
		5 · 10 ⁻⁴ m	8 o	39 (+)	9 o	0 o	0 o
	Co ⁺⁺	10 ⁻⁷ m	0 o	33 (+)	0 o	60 ++	24 o
		10 ⁻⁵ m	0 o	41 +	0 o	50 ++	26 o
		10 ⁻⁴ m	9 (o)	40 +	0 o	44 (+)	25 o
		5 · 10 ⁻⁴ m	0 o	20 o	0 o	44 (+)	0 o

Tabelle 15: Wie Tabelle 14. Reaktivierungsversuche jedoch mit gegen 10⁻³ m Na₂EDTA-Lösung dialysiertem Plasma.

Tab. 16: Vergleich der im biologischen Test ermittelten Substratmengen, wenn derselbe Ansatz an zwei Ratten getestet worden ist. N = Nummer der Testpaare. T_1 = an 1. Ratte ermittelte Substratmenge in ng. T_2 = an 2. Ratte ermittelte Substratmenge in ng. $D = T_1 - T_2$, ohne Berücksichtigung der Vorzeichen.

N	T_1	T_2	D	D^2	N	T_1	T_2	D	D^2
1	20,0	18,0	2,0	4,00	17	17,0	18,5	1,5	2,25
2	19,7	19,8	0,1	0,01	18	18,0	15,3	2,7	7,29
3	17,8	16,9	0,9	0,81	19	16,5	18,0	1,5	2,25
4	20,0	19,3	0,7	0,49	20	12,5	12,8	0,3	0,09
5	19,1	20,0	0,9	0,81	21	7,0	6,9	0,1	0,01
6	17,2	17,4	0,2	0,04	22	11,2	10,0	1,2	1,44
7	10,3	10,9	0,6	0,36	23	11,1	10,0	1,1	1,21
8	10,9	10,0	0,9	0,81	24	16,4	15,0	1,4	1,96
9	11,0	11,0	0,0	0,00	25	9,6	11,6	2,0	4,00
10	14,9	14,6	0,3	0,09	26	10,0	11,9	1,9	3,61
11	10,6	11,0	0,4	0,16	27	11,7	12,5	0,8	0,64
12	12,0	11,6	0,4	0,16	28	13,9	11,8	1,1	1,21
13	10,3	10,5	0,2	0,04	29	20,0	20,0	0,0	0,00
14	12,9	11,7	1,2	1,44	30	20,0	20,0	0,0	0,00
15	19,8	20,0	0,2	0,04	31	19,2	19,0	0,2	0,04
16	17,3	17,5	0,2	0,04					<u>25,0</u>
									<u>35,30</u>

Mittlere Differenz: $Mw_D = \Sigma D/N = 25/31 = 0,81$ ng

$$(\Sigma D)^2 = 625 \text{ ng}$$

$$S_D = \sqrt{\frac{\Sigma D^2 - (\Sigma D)^2/N}{N - 1}} = 0,714 \text{ ng}$$

Differenzen, die den Wert von $Mw_D + 2 \times S_D = 0,81 + 1,428 = 2,238$ ng überschreiten, sind mit 95%iger Wahrscheinlichkeit nicht mehr zufallsbedingt, sondern signifikant für einen Substratabbau.

Tab. 17: Vergleich der im biologischen Test ermittelten Substratmengen, wenn die Inkubation unter gleichen Bedingungen wiederholt und jeder Ansatz an einer anderen Ratte getestet worden ist. N = Nummer der Testpaare. I₁ = nach 1. Inkubation ermittelte Substratmenge in ng. I₂ = nach 2. Inkubation ermittelte Substratmenge in ng.

N	I ₁	I ₂	D	D ²	N	I ₁	I ₂	D	D ²
1	20,0	20,0	0,0	0,00	17	18,5	16,5	1,6	2,56
2	19,7	19,1	0,6	0,36	18	15,3	19,3	4,0	16,00
3	17,8	17,0	0,8	0,64	19	18,0	20,0	2,0	4,00
4	20,0	18,0	2,0	4,00	20	12,8	17,4	4,6	21,16
5	19,1	15,5	3,6	12,96	21	6,9	10,9	4,0	16,00
6	17,2	15,2	2,0	4,00	22	10,0	10,0	0,0	0,00
7	10,3	7,0	3,3	10,89	23	10,0	11,0	1,0	1,00
8	10,9	11,2	0,3	0,09	24	15,0	14,6	0,4	0,16
9	11,0	11,1	0,1	0,01	25	11,6	11,0	0,6	0,36
10	14,9	16,4	1,5	2,25	26	11,9	11,6	0,3	0,09
11	10,6	7,8	3,2	10,24	27	12,5	10,5	2,0	4,00
12	12,0	10,0	2,0	4,00	28	11,8	11,7	0,1	0,01
13	10,3	11,7	1,4	1,96	29	20,0	18,1	1,9	3,61
14	12,9	13,9	1,0	1,00	30	20,0	20,8	0,8	0,64
15	20,0	18,0	2,0	4,00	31	19,2	20,0	0,8	0,64
16	17,5	17,8	0,3	0,09					
					<u>48,6</u> <u>126,72</u>				

Mittlere Differenz: $Mw_D = \Sigma D/N = 48,6/31 = 1,56$ ng

$(\Sigma D)^2 = 2361,96$ ng

$$S_D = \sqrt{\frac{\Sigma D^2 - (\Sigma D)^2/N}{N-1}} = 1,35 \text{ ng}$$

Differenzen, die den Wert von $Mw_D + 2 \times S_D = 1,56 + 2,7 = 4,26$ ng überschreiten, sind mit 95%iger Wahrscheinlichkeit nicht mehr zufallsbedingt, sondern signifikant für einen Substratabbau.

Tab. 18: Vergleich der im biologischen Test ermittelten Substratmengen, wenn zwei unter gleichen Bedingungen inkubierte Ansätze an derselben Ratte getestet worden sind. N = Nummer der Testpaare. I_1 = nach 1. Inkubation ermittelte Substratmenge in ng. I_2 = nach 2. Inkubation ermittelte Substratmenge in ng. $D = I_1 - I_2$, ohne Berücksichtigung der Vorzeichen.

N	I_1	I_2	D	D^2	N	I_1	I_2	D	D^2
1	19,2	20,0	0,8	0,64	17	19,0	19,0	0,0	0,00
2	10,6	11,0	0,4	0,16	18	17,8	17,5	0,3	0,09
3	20,0	21,1	1,1	1,21	19	9,4	9,3	0,1	0,01
4	10,0	10,8	0,8	0,64	20	17,9	19,2	1,3	1,69
5	20,0	20,0	0,0	0,00	21	8,5	8,7	0,2	0,04
6	11,8	10,0	1,8	3,24	22	20,0	19,5	0,5	0,25
7	18,8	20,0	1,2	1,44	23	20,0	20,0	0,0	0,00
8	20,8	21,5	0,7	0,49	24	10,0	10,0	0,0	0,00
9	23,0	24,5	1,5	2,25	25	19,3	17,9	1,4	1,96
10	11,5	12,5	1,0	1,00	26	10,5	10,0	0,5	0,25
11	20,0	20,0	0,0	0,00	27	19,0	19,4	0,4	0,16
12	10,0	10,0	0,0	0,00	28	18,2	18,2	0,0	0,00
13	21,5	22,5	1,0	1,00	29	18,0	17,0	1,0	1,00
14	11,5	11,9	0,4	0,16	30	20,0	20,0	0,0	0,00
15	13,8	12,0	1,8	3,24	31	18,8	20,0	1,2	1,44
16	18,2	19,0	0,8	0,64				<u>21,7</u>	<u>26,25</u>

Mittlere Differenz: $Mw_D = \Sigma D/N = 21,7/31 = 0,70$ ng

$$(\Sigma D)^2 = 470,89 \text{ ng}$$

$$S_D = \sqrt{\frac{\Sigma D^2 - (\Sigma D)^2/N}{N-1}} = 0,61 \text{ ng}$$

Differenzen, die den Wert von $Mw_D + 2 \times S_D = 0,70 + 1,22 = 1,92$ ng überschreiten, sind mit 95%iger Wahrscheinlichkeit nicht mehr zufallsbedingt, sondern signifikant für einen Substratabbau.

Tab. 19: Vergleich der mit dem biologischen Test ermittelten Abbauraten, wenn dasselbe Ansatzpaar (Null- und Zeitwert einer Inkubation) an zwei Ratten getestet worden ist. N = Nummer der Versuchspaare. T_1 = an 1. Ratte ermittelte Abbaurrate in % vom Nullwert. T_2 = an 2. Ratte ermittelte Abbaurrate in % vom Nullwert. $D = T_1 - T_2$, ohne Berücksichtigung der Vorzeichen.

N	T_1	T_2	D	D^2	N	T_1	T_2	D	D^2
1	0	0	0	0	17	26	17	9	81
2	14	18	4	16	18	5	14	9	81
3	22	22	0	0	19	20	10	10	100
4	5	11	6	36	20	37	36	1	1
5	22	20	2	4	21	65	68	3	9
6	5	0	5	25	22	42	47	5	25
7	52	51	1	1	23	45	45	0	0
8	43	46	3	9	24	18	25	7	49
9	43	45	2	4	25	53	45	8	64
10	25	27	2	4	26	48	46	2	4
11	47	45	2	4	27	45	43	2	4
12	45	47	2	4	28	33	41	8	64
13	51	49	2	4	29	3	2	1	1
14	36	39	3	9	30	20	30	10	100
15	5	0	5	25	31	57	59	2	4
16	19	15	4	16				<u>120</u>	<u>748</u>

Mittlere Differenz: $Mw_D = \sum D/N = 120/31 = 3,88$ % Abbau

$$(\sum D)^2 = 14400$$

$$S_D = \sqrt{\frac{\sum D^2 - (\sum D)^2/N}{N-1}} = 3,08 \text{ % Abbau}$$

Differenzen, die den Wert von $Mw_D + 2 \times S_D = 3,88 + 6,16 = 10,04$ % überschreiten, sind mit 95%iger Wahrscheinlichkeit nicht mehr zufallsbedingt, sondern signifikant für eine unterschiedliche Abbaugeschwindigkeit des Substrats.

Tab. 20: Vergleich der mit dem biologischen Test ermittelten Abbauraten, wenn die Inkubation unter gleichen Bedingungen wiederholt worden ist und die zusammengehörenden Ansatzpaare (Null- und Zeitwert einer Inkubation) an verschiedenen Ratten getestet worden sind. N = Nummer der Versuchspaare. I_1 = nach 1. Inkubation ermittelte Abbauraten in % vom Nullwert. I_2 = nach 2. Inkubation ermittelte Abbauraten in % vom Nullwert. $D = I_1 - I_2$, ohne Berücksichtigung der Vorzeichen.

N	I_1	I_2	D	D^2	N	I_1	I_2	D	D^2
1	0	5	5	25	17	22	17	5	25
2	14	19	5	25	18	14	6	8	64
3	22	26	4	16	19	10	0	10	100
4	5	5	0	0	20	26	20	6	36
5	22	37	15	225	21	68	55	13	169
6	5	15	10	100	22	47	46	1	1
7	52	65	13	169	23	45	45	0	0
8	43	42	1	1	24	25	27	2	4
9	43	45	2	4	25	40	45	5	25
10	25	18	7	49	26	46	46	1	1
11	47	53	6	36	27	43	49	6	36
12	45	48	3	9	28	41	39	2	4
13	51	45	6	36	29	2	0	2	4
14	36	33	3	9	30	20	19	1	1
15	0	0	0	0	31	57	58	1	1
16	19	16	3	9					
								<u>145</u>	<u>1184</u>

Mittlere Differenz: $Mw_D = \sum D/N = 145/31 = 4,68$ % Abbau

$$(\sum D)^2 = 21025$$

$$S_D = \sqrt{\frac{\sum D^2 - (\sum D)^2/N}{N-1}} = 4,12 \text{ % Abbau}$$

Differenzen, die den Wert von $Mw_D + 2 \times S_D = 4,68 + 8,24 = 12,92$ % überschreiten, sind mit 95%iger Wahrscheinlichkeit nicht mehr zufallsbedingt, sondern signifikant für eine unterschiedliche Abbaugeschwindigkeit des Substrats.

Tab. 21: Vergleich der mit dem optischen Test ermittelten Extinktionsänderungen, wenn die Inkubation unter gleichen Bedingungen wiederholt worden ist. N = Nummer der Testpaare. I_1 = nach 1. Inkubation ermittelte Extinktionsänderung. I_2 = nach 2. Inkubation ermittelte Extinktionsänderung. $D = I_1 - I_2$, ohne Berücksichtigung der Vorzeichen und der Kommastellen. Der Wert von D ist mit 10^{-3} und der Wert von D^2 mit 10^{-6} zu multiplizieren.

N	I_1	I_2	D	D^2	N	I_1	I_2	D	D^2
1	0,076	0,081	5	25	15	0,076	0,067	9	81
2	0,097	0,101	4	16	16	0,081	0,075	6	36
3	0,120	0,108	12	144	17	0,080	0,075	5	25
4	0,096	0,106	10	100	18	0,076	0,075	1	1
5	0,107	0,112	5	25	19	0,056	0,060	4	16
6	0,116	0,109	7	49	20	0,068	0,068	0	0
7	0,096	0,091	5	25	21	0,080	0,085	5	25
8	0,076	0,090	14	196	22	0,072	0,079	7	49
9	0,106	0,115	9	81	23	0,062	0,074	12	144
10	0,110	0,116	6	36	24	0,047	0,069	22	484
11	0,131	0,122	9	81	25	0,053	0,054	1	1
12	0,044	0,032	12	144	26	0,086	0,080	6	36
13	0,029	0,055	26	676	27	0,089	0,098	9	81
14	0,055	0,058	3	9					
								<u>214</u>	<u>2586</u>

Mittlere Differenz: $Mw_D = \sum D / N = 214 / 27 = 7,92 \times 10^{-3}$

$$(\sum D)^2 = 45769 \times 10^{-6}$$

$$S_D = \sqrt{\frac{\sum D^2 - (\sum D)^2 / N}{N - 1}} = 5,85 \times 10^{-3}$$

Differenzen, die den Wert von $Mw_D + 2 \times S_D = 0,00792 + 0,0117 = 0,01962$ Extinktionseinheiten überschreiten, sind mit 95%iger Wahrscheinlichkeit nicht mehr zufallsbedingt, sondern signifikant für eine unterschiedliche Abbaugeschwindigkeit.

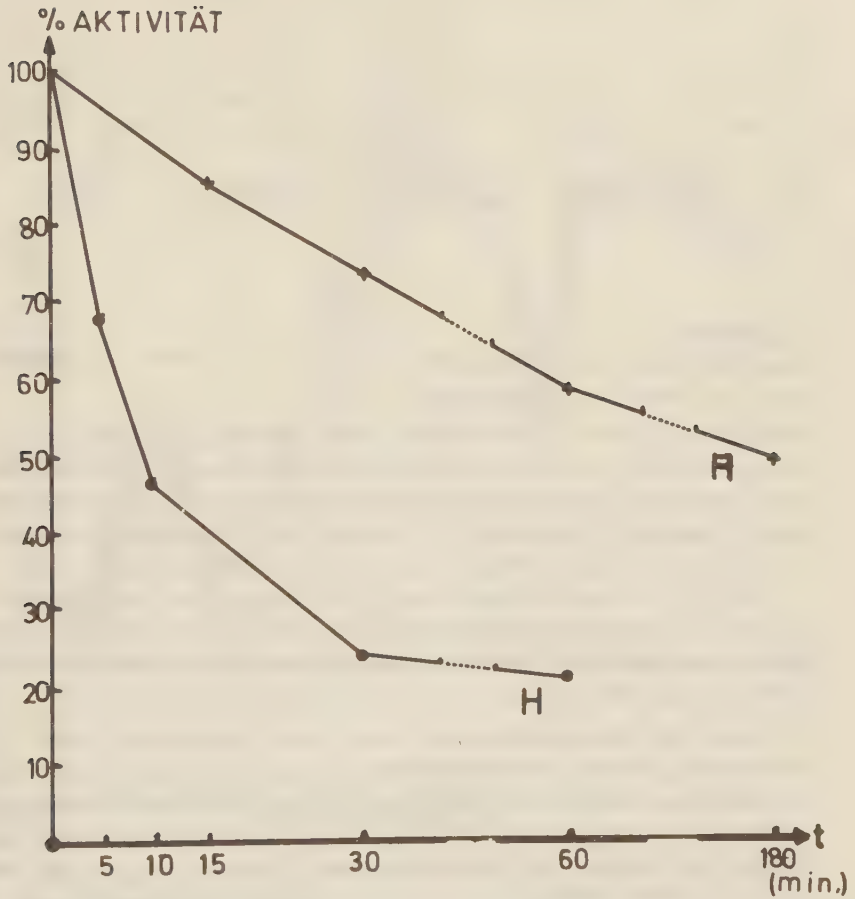


Abbildung 2:

Biologische Inaktivierung von Angiotensin II (A) +—+ und Angiotensin II-Amid (H) — durch 1:10 mit Trismaleatpuffer pH 7,2 verdünntes menschliches Mischplasma in Abhängigkeit von der Zeit. Substratkonzentration = 100 ng/ml.

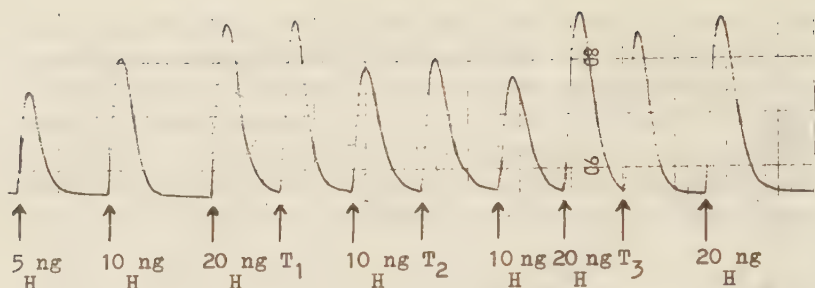


Abbildung 3:

Angiotensinbestimmung im Blutdrucktest an der Ratte und Berechnung der Inaktivierungsraten.

Jeweils 0,2 ml der zu testenden Lösung werden intravenös injiziert. Registriert wird der Mitteldruck in der Carotis-Arterie über PVC-Katheter und Hg-Manometer. Papiervorschub des Kymographen 4 mm/min. 1 Teilstrich = 2 mm Hg. ng H = Nanogramm Hypertensin^R (Angiotensin II-Amid) in 0,2 ml Standard-Lösung.

T₁ bis T₃ = je 0,2 ml einer Probe mit unbekannter Angiotensinmenge. Die Angiotensinmenge der Probe wird durch Vergleich mit der Blutdruckwirkung der Angiotensin-Standardlösungen über Dreisatzrechnung ermittelt.

T₁ zeigt den Druckanstieg durch eine nicht inkubierte Probe (Nullwert), deren Angiotensingehalt 20 ng beträgt. T₂ zeigt den Druckanstieg durch die zugehörige inkubierte Probe (Zeitwert). Erkennbar am geringeren Druckanstieg bei dem nach der Probe injiziertem Standard (21 mm Hg gegenüber 23 mm Hg bei vor der Probe injiziertem Standard) hat sich die Angiotensinempfindlichkeit der Ratte geändert. Daher wird der Angiotensingehalt der Probe T₂ mit dem Mittelwert der vor und nach der Probe gefundenen Druckanstiege durch den Standard mit 10 ng H ermittelt, der 22 mm Hg beträgt. Der Druckanstieg bei T₂ beträgt 24 mm Hg. Durch Dreisatzrechnung läßt sich der Angiotensingehalt der Probe T₂ mit 10,9 ng ermitteln. Im Vergleich zum Nullwert (20 ng H) sind also während der Inkubation 9,1 ng H inaktiviert worden, das sind 45,5 Prozent vom Nullwert.

% VERLUST AN PRESSORISCHER WIRKUNG

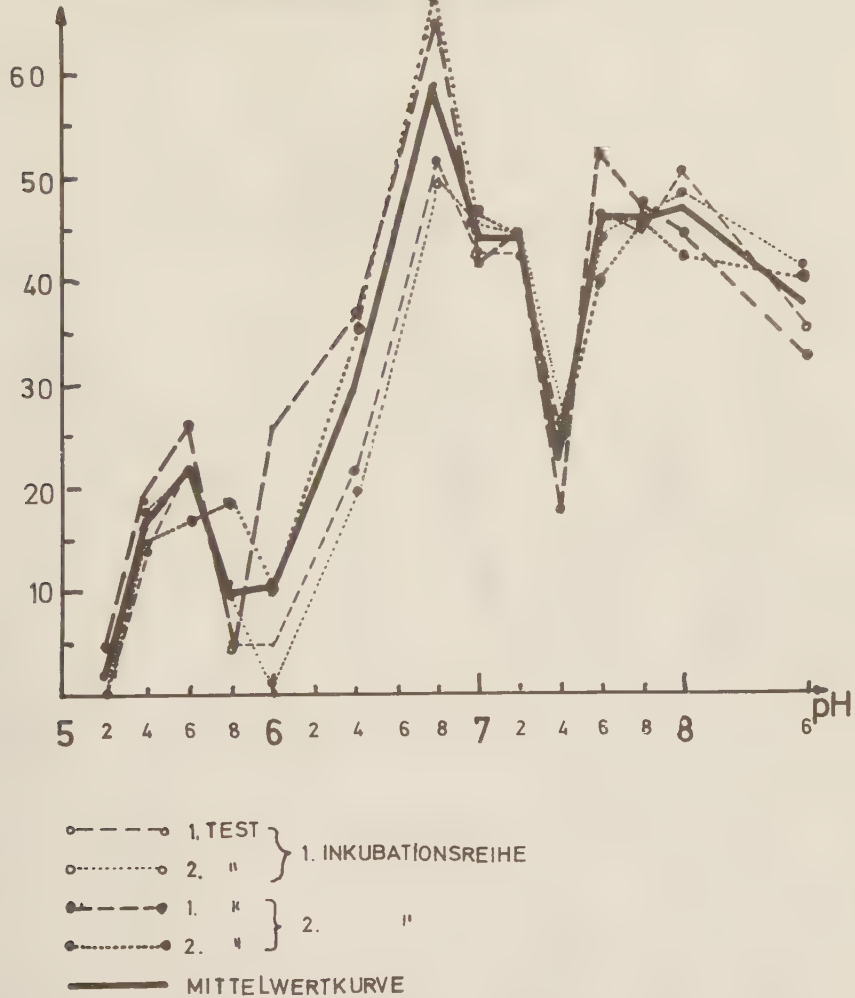


Abbildung 4: Biologische Inaktivierung von Angiotensin II (A) durch 1:10 verdünntes menschliches Plasma in Abhängigkeit vom pH-Wert des 0,04M Trismaleatpuffers. Inkubationszeit: 120 Min. Substratkonzentration: 100 ng/ml. Werte aus zwei Inkubationsreihen, die je zweimal getestet worden sind. Werte der 1. Inkubationsreihe in Tab. 2; Werte der 2. Inkubationsreihe in Tab. 6; Werte der Mittelwertkurve in Tab. 4.

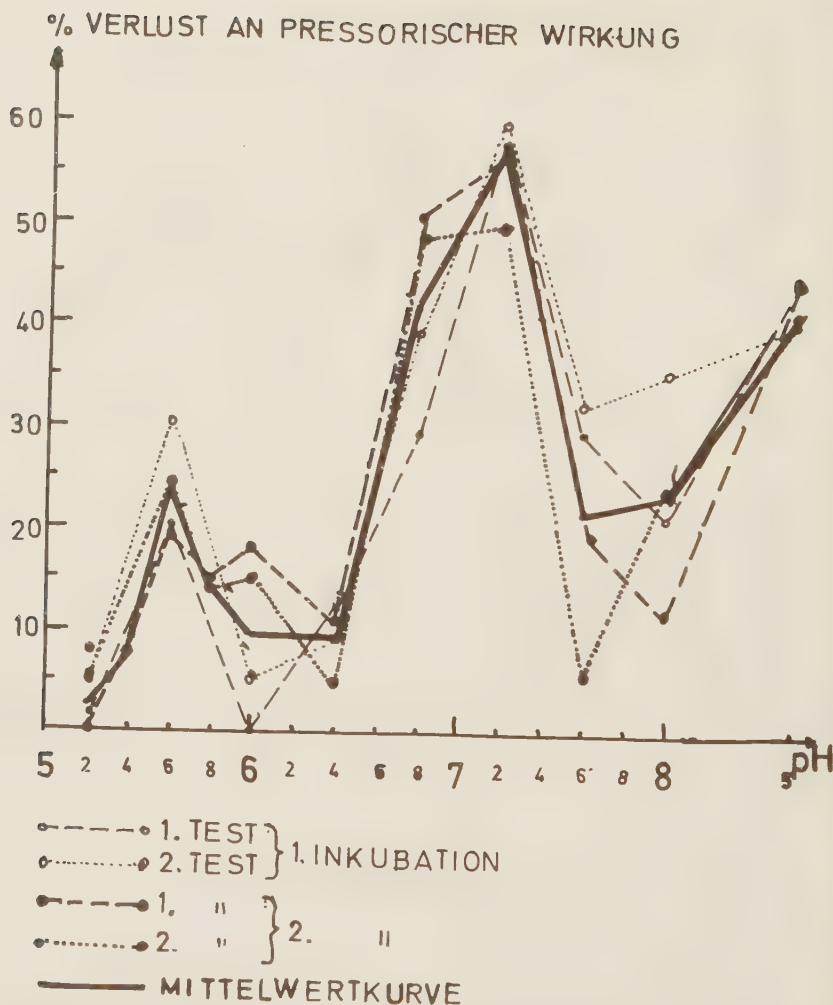


Abbildung 5: Biologische Inaktivierung von Angiotensin II-Amid (H) durch 1:10 verdünntes menschliches Plasma in Abhängigkeit vom pH-Wert des 0,04 M Trismaleatpuffers. Inkubationszeit: 10 Min. Substratkonzentration 100 ng/ml. Werte aus zwei Inkubationsreihen, die je zweimal getestet worden sind. Werte der 1. Inkubationsreihe in Tab. 3; Werte der 2. Inkubationsreihe in Tab. 7; Werte der Mittelwertkurve in Tab. 4.

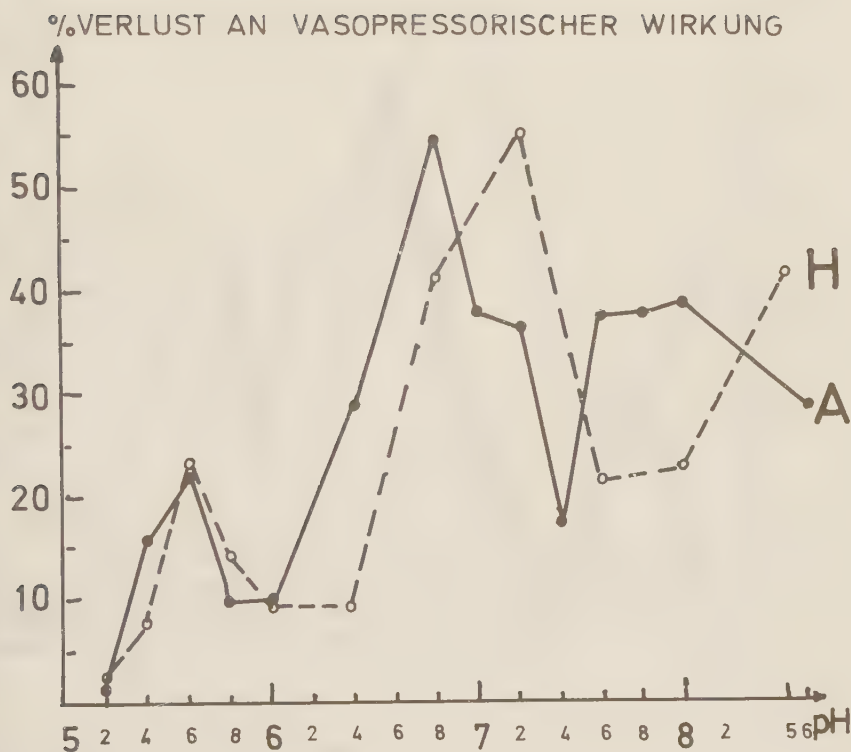


Abbildung 6: Vergleich der biologischen Inaktivierung von Angiotensin II (A) ●—● und Angiotensin II-Amid (H) ○- -○ durch 1:10 verdünntes menschliches Plasma in Abhängigkeit vom pH des 0,04 M Trismaleatpuffers. Inkubationsdauer mit Substrat A: 120 Min., mit Substrat H: 10 Min. Mittelwert aus zwei Inkubationsreihen, die je zweimal getestet worden sind. Werte aus Tab. 4. Substratkonzentration: 100 ng A/ml.

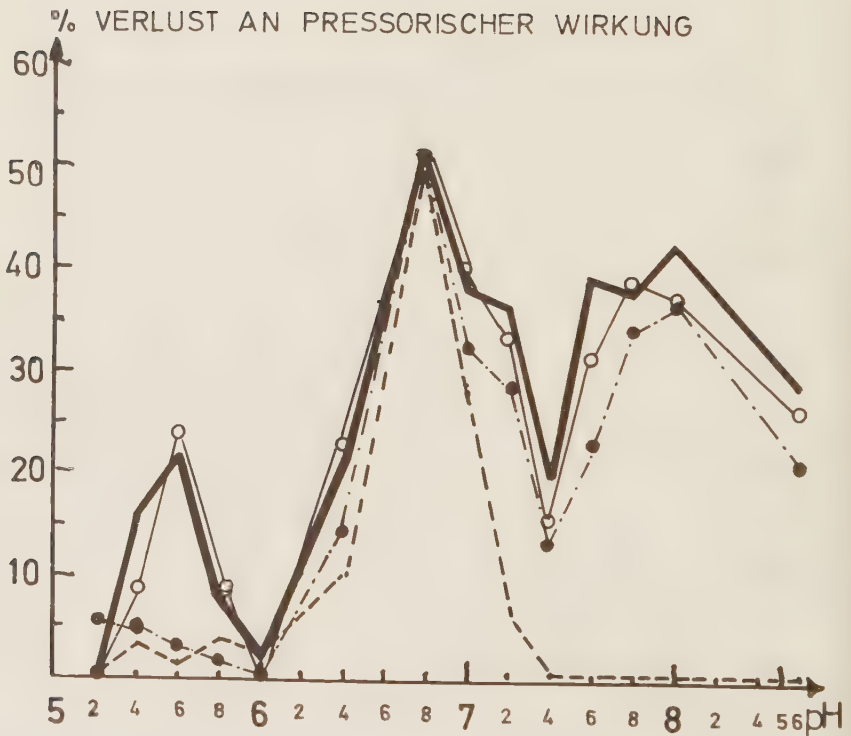


Abbildung 7: Biologische Inaktivierung von Angiotensin II (A) durch menschliches Plasma in Abhängigkeit vom pH des 0,04 M Trismaleatpuffers ohne Zusatz von Affektoren (●—●), mit 10^{-3} M Na_2EDTA (---), mit 10^{-3} M CaCl_2 (○—○) und mit 10^{-3} M Na_2EDTA + 3×10^{-3} M CaCl_2 (-.-.-). Inkubationszeit: 120 Min. Substratkonzentration 100 ng/ml. Ergebnisse sind Mittelwerte von Doppelbestimmungen aus Tabellen 6, 8, 9 und 10.

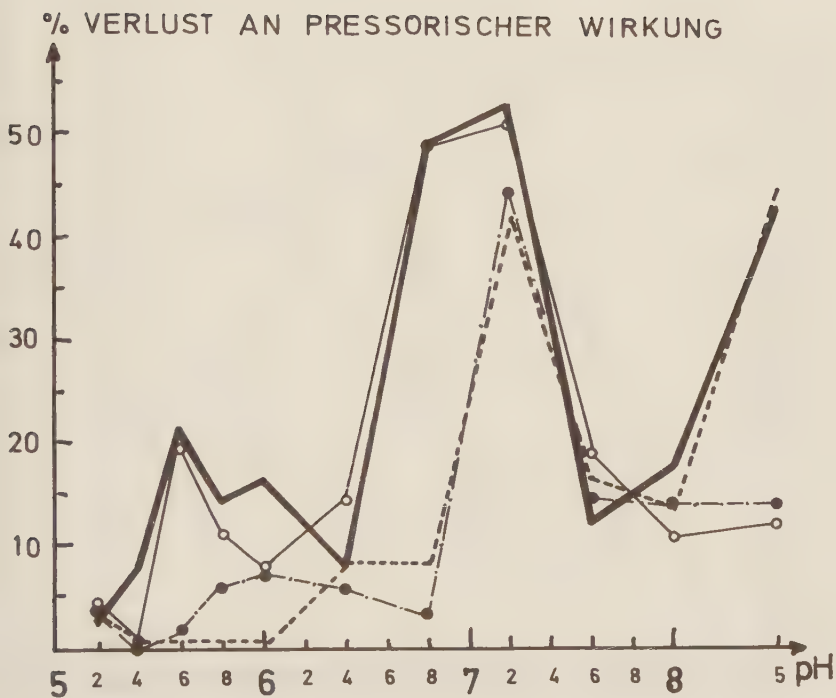


Abbildung 8: Biologische Inaktivierung von Angiotensin II-Amid (H) durch menschliches Plasma in Abhängigkeit vom pH des 0,04 M Trismaleatpuffers ohne Zusatz von Affektoren (●—●), mit 10⁻³ M Na₂EDTA (---), mit 10⁻³ M CaCl₂ (○—○) und mit 10⁻³ M Na₂EDTA + 3x10⁻³ M CaCl₂ (-.-.-.-). Inkubationszeit: 0 Min. Substratkonzentration 100 ng/ml. Ergebnisse sind Mittelwerte von Doppelbestimmungen aus Tabellen 7, 11, 12 und 13.

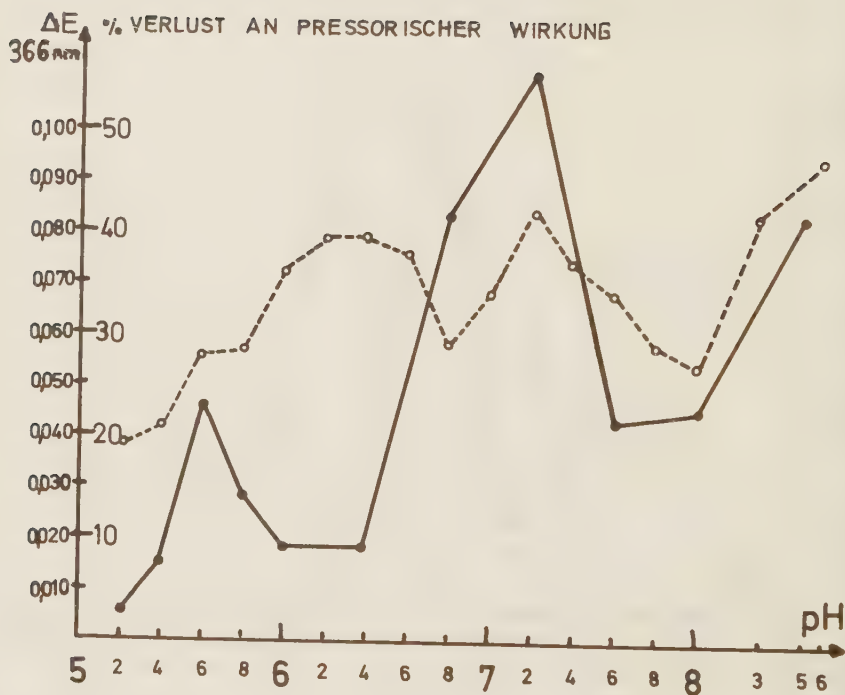


Abbildung 9: Vergleich der biologischen Inaktivierung (% Verlust an pressorischer Wirkung) von Angiotensin II-Amid (●—●) mit der Geschwindigkeit der Asparagin-Abspaltung aus Angiotensin II-Amid (○- -○) in Abhängigkeit vom pH des 0,04 M Tris-maleatpuffers. Die Aminopeptidaseaktivität (Mittelwerte von zwei Inkubationsreihen) ist in Extinktionseinheiten (366 nm) angegeben.

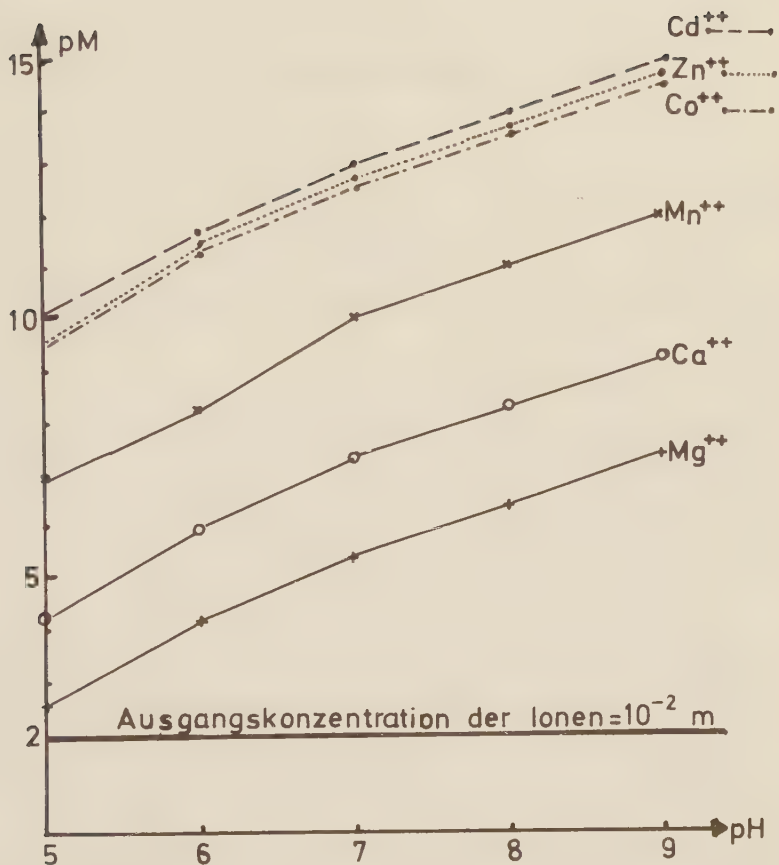


Abbildung 10: Der negative Logarithmus der Konzentration zweiwertiger Metallionen zur Basis 10 (pM-Wert) bei Anwesenheit von Na_2EDTA in 100%igem Überschuß (2×10^{-2} m) der Metallionenausgangskonzentration (10^{-2} m) in Abhängigkeit vom pH-Wert. Nach einer Tabelle aus CHABEREK, ST und A.E. MARTELL, Organic Sequestering Agents, John Wiley & Sons, Inc. Publishers, New York (1959) ▽

LITERATURVERZEICHNIS

1. BOCK, K.H.: Ätiologie und Pathogenese des Hochdrucks, Internist 2, 86, 1968
2. DUSTAN, H.P. und I.H.PAGE: Renovaskulärer Hochdruck, Internist 2, 110, 1968
3. PEART, W.S.: The renin-angiotensin system, Pharmacol. Rev. 17, 143, 1965
4. NG, K.K.F. and J.R.VANE: Conversion of angiotensin I to angiotensin II, Nature (London) 216, 762, 1972
5. BIRON, P., L.CAMPAU and P.DAVID: Fate of angiotensin I and II in the human pulmonary circulation, Amer. Journ. Card. 24, 544, 1969
6. RINIKER, B.: Recent work on the chemistry and biochemistry of angiotensin II, Metabolism 13, 1247, 1964
7. RITTEL, W., B.ISELIN, H.KAPPELER, B.RINIKER und R.SCHWYZER: Synthese von Hypertensin II-Peptiden, Angew. Chemie 69, 179, 1957
8. BUMPUS, F.M., H.SCHWARZ and I.H.PAGE: Synthesis and pharmacology of the octapeptide angiotensin, Science 125, 886, 1957
9. GROSS, F.: Renin und Hypertensin, physiologische oder pathologische Wirkstoffe? Klin. Wschr. 36, 693, 1958
10. ARAKAWA, K.: Human angiotensin, Saishin Igaku 22, 858, 1967
11. RINIKER, B., H.BRUNNER und R.SCHWYZER: B-Asp¹-Val⁵-Hypertensin II, ein Hypertensin-Analoges besonders hoher biologischer Aktivität, Angew. Chemie 74, 469, 1962
12. REGOLI, D., B.RINIKER und H.BRUNNER: The enzymatic degradation of various angiotensin II derivatives by serum, plasma or kidney homogenate, Biochem. Pharmacol. 12, 637, 1963
13. KHAILLALLAH, P.A., E.M.BUMPUS, I.H.PAGE and R.R.SPEBY: Angiotensinase with a high degree of specificity in plasma and red cell, Science 140, 672, 1963
14. KLAUS, D., H.KAFFARNIK und H.PFEIL: Untersuchungen über die Serum-Angiotensinase (1.Mitteilung). Klin. Wschr. 41, 376, 1963
15. KLAUS, D. and P.BIRON: Elektrophoretic behaviour of serum angiotensinase, Nature (London) 204, 381, 1964
16. NAGATSU, I., L.GILLESPIE, J.F.FOLK and G.G.GLENNER: Serum aminopeptidases, "angiotensinase", and hypertension I, degradation of angiotensin II by human serum, Biochem. Pharmacol. 14, 721, 1965

17. OELKERS, W. und I. U. v. GOLDACKER: Bestimmung der Angiotensinase- (Amino-peptidase-) Aktivität im Serum mit einem DPN-H-abhängigen optischen Test, *Klin. Wschr.* 45, 649, 1967
18. KHAIRALLAH, P. A., I. H. PAGE, F. M. BUMPUS and R. K. TÜRKER: Angiotensin tachyphylaxis and its reversal, *Circulation Res.* 19, 247, 1966
19. KHAIRALLAH, P. A. and I. H. PAGE: Plasma angiotensinases, *Biochemical Medicine* 1, 1, 1967
20. LUBASH, G. D., E. C. HAMTEL and J. R. MEARLES: Serum angiotensinase activity in hypertension, *Clin. Chim. Acta* 18, 439, 1967
21. OSBORN, E. C., G. JERUMS and B. A. JUPP: Plasma angiotensinase activity in relation to the breakdown of phenylthiocarbamyl-angiotensin II amide in the hypertensive and normotensive patients, *Cardiovasc. Res.* 2, 31, 1968
22. NAGATSU, I., L. GILLESPIE, J. M. GEORGE, J. F. FOLK and G. G. GLENNER: Serum aminopeptidases, "angiotensinase", and hypertension II. Amino acid β -naphthylamide hydrolysis by normal and hypertensive serum, *Biochem. Pharmacol.* 14, 853, 1965
23. v. GOLDACKER, I. U. und W. OELKERS: Aminopeptidaseaktivität gegen Angiotensin II-Amid im Serum von Gesunden, Schwangeren, Hypertonikern und Leberkranken, *Z. Klin. Chemie u. Klin. Biochem.* 7, 250, 1969
24. KLAUS, D., A. DAUM und H. UEHLEKE: Beeinflussung der Blutdruckwirkung von Renin und Angiotensin durch Aminopeptidase, *Verh. dtsch. Ges. inn. Med.* 72, 137, 1966
25. HODGE, R. L., K. K. F. NG and J. R. VANE: Disappearance of angiotensin from the circulation of the dog, *Nature (London)*, 215, 138, 1967
26. CARRETERO, O. and F. GROSS: Renin substrate in plasma under various experimental conditions in the rat, *Am. J. Physiol.* 213, 695, 1967
27. GOULD, A. B., L. T. SKEGGS and J. R. KAHN: Measurement of renin and substrate concentration in human serum, *Lab. Invest.* 15, 1802, 1966
28. BOYD, G. W., J. LANDON and W. S. PEART: Radioimmunoassay for determining plasma-levels of angiotensin II in man, *Lancet II*; 1002, 1967
29. CATT, K. J., M. C. CAIN and J. L. COGHLAN: Measurement of angiotensin II in blood, *Lancet II*: 1005, 1967

30. VALLOTEN, M.B., L.B. PAGE and E. HABER: Radioimmunoassay of angiotensin in human plasma, *Nature (London)*, 215, 714
31. PAGE, L.B., E. HABER, A.Y. KIMURA et al.: Studies with the radioimmunoassay for angiotensin II, and its application to measurement of renin activity, *J. Clin. Endocrin.* 29, 200, 1969
32. POULSEN, K.: Estimation of plasma-renin concentration using radioimmunoassay of Angiotensin II, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 24, 291, 1969
33. HABER, E., KOERNER, T., L.B. PAGE et al.: Application of a radioimmunoassay for Angiotensin I to the physiologic measurement of plasma-renin activity in normal human subjects, *J. Clin. Endocrin.* 29, 1349, 1969
34. BOYD, G.W., A.E. FITZ, A.R. ADAMSON et al.: Radioimmunoassay determination of plasma-renin activity, *Lancet I*: 213, 1969
35. STOCKIGT, J.R., R.D. COLLINS, E.G. BIGLIERE: Determination of plasma-renin concentration by angiotensin I immunoassay. Diagnostic import of precise measurement of subnormal renin in hyperaldosteronism, *Circ. Res.* 28, Suppl.2: 175, 1971
36. KAPLAN, N.M. and J.G. SILAH: The angiotensin-infusion test, a new approach to the differential diagnosis of renovascular hypertension, *New Engl. J. Med.* 271, 563, 1964
37. GROSS, F., K.D. BOCK und TURRIAN, H.: Untersuchungen über die Blutdruckwirkung von Angiotensin, *Helv. Physiol. Acta* 19, 42, 1961
38. SKEGGS, L.T. Jr., J.R. KAHN and W.H. MARSH: A method of assaying small amounts of hypertensin, *Laboratory Invest.* 2, 109, 1953
39. GROSS, F.: Angiotensin, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. exp. Path.* 245, I, 196, 1962
40. COOK, W.F. and M.R. LEE: The preparation of rabbit renin-substrate for the assay of minute amounts of renin, *Biochem. J.* 96, 413, 1965
41. KLAUS, D.: Aminopeptidasen im menschlichen Serum, *Ärztl. Forschung* 15, 548, 1961
42. ITZKOVITZ, H.D. and L. MILLER: Differential studies of angiotensinase activities from several tissue sources, *Amer. J. Med. Sci.* 254, 101/659, 1967
43. DOCUMENTA GEIGY, Wissenschaftliche Tabellen, 6. Auflage, Basel 1960
44. RAPOPORT, S.M. und H.-J. RADERECHT: Physiologisch-chemisches Praktikum, 3. Auflage, VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin 1962

45. CHABEREK, ST. and A.E. MARTELL: Organic sequestering agents, John Wiley & Sons, Inc. Publishers, New York 1959
46. KOKUBU, T., E. UEDA, S. FUJIMOTO, K. HIWADA, H. SANGA and Y. YAMAMURA: Angiotensinase in red cells, Clin. Chim. Acta 13, 13, 1966
47. SAMBHI, M.P. and J.P. BARRET: Clin. Res. 14, 149, 1966
48. PICKENS, P.T., F.M. BUMPUS, A.M. LLOYD, R.R. SMEBY and I.H. PAGE: Measurement of renin-activity in human plasma, Circ. Res. 17, 438, 1965

L E B E N S L A U F

Am 19. 6. 1943 als Sohn des Justizamtmanns Heinz Zwanzig und seiner Ehefrau Theodora, geborene Müller, in Berlin geboren. Nach sechs Grundschuljahren Besuch des naturwissenschaftlich-mathematischen Zuges der Paul-Natorp-Schule in Berlin-Friedenau bis zur am 21. Februar 1963 bestandenen Reifeprüfung. Medizinstudium vom 22. März 1963 bis zur am 5. August 1969 bestandenen ärztlichen Prüfung an der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin.

In den Jahren 1967 und 1968 experimentelle Arbeiten zur vorliegenden Inaugural-Dissertation unter Anregung und Anleitung von Herrn Professor Dr. med. Wolfgang Oelkers als Doktorvater an der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik der Freien Universität Berlin im Städtischen Krankenhaus Westend.

Approbation als Arzt nach Abschluß der Medizinalassistentenzeit - chirurgischer Teil am Städtischen Krankenhaus St. Blasien, medizinischer Teil am Kreiskrankenhaus Land Hadeln - am 19. Oktober 1970. Anschließend zehn Monate Assistenzarzt an der chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Land Hadeln in Otterndorf. Seit dem 1. 7. 1971 Wissenschaftlicher Angestellter an der chirurgischen Klinik der Medizinischen Akademie Lübeck.

Seit dem 3. Januar 1972 ist die Weiterbildung durch die Einberufung zum Bundesgrenzschutz, bei dem ersatzweise der Grundwehrdienst als Stabsarzt der Reserve geleistet werden muß, unterbrochen.

Michael Zwanzig

